

Aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung
(Direktorin: Prof. Dr. Susanne Sebens)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Rolle von Galektin-3 in Metastasierungs-assoziierten
Prozessen von Pankreasadenokarzinomzellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Meike Schöll-Naderer
aus Herdecke

Kiel 2020

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Daniela Wesch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 27.10.2020

gez.: Prof. Dr. med. Johann Roider
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Pathogenese	1
1.1.2 Metastasierungskaskade und Prozesse der Metastasierung	2
1.2 Galektine	3
1.2.1 Vorkommen und Funktionen	3
1.2.2 Galektin-3 – Aufbau und Funktionen	4
1.2.3 Galektin-3 im PDAC	5
1.2.4 Galektin-3 bei Adhäsions- und Migrationsprozessen.....	5
1.2.5 Galektin-3 – Mechanismen der Interaktion	6
1.3 Pflanzliche Polysaccharide zur Hemmung von Galektin-3	7
1.4 Ziel der Arbeit	8
2 Material	10
2.1 Chemikalien und Reagenzien.....	10
2.2 Puffer	11
2.3 Zellkultur-Material	11
2.3.1 Zelllinien	11
2.3.2 Kultur-Medien	12
2.4 Molekularbiologisches Material	13
2.4.1 <i>Small interfering RNA</i>	13
2.5 Pflanzliche Polysaccharide	13
2.6 Antikörper	13
2.7 Verbrauchsmaterial	14
2.8 Software.....	15
2.9 Laborgeräte.....	15
3 Methoden.....	17
3.1 Zellbiologische Methoden	17
3.1.1 Zelllinien	17
3.1.2 Kultivierung von Zelllinien	17
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl	18
3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	18
3.2 Transfektion mit siRNA	18
3.3 Charakterisierung des Migrationsverhaltens mittels <i>Life-Cell-Imager</i> (JuLi Br)	19

3.4	Charakterisierung des Migrationsverhaltens mittels <i>Wound-healing-Assay</i>	19
3.5	Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens mittels <i>Adhäsionsassay</i>	20
3.6	Proteingewinnung aus Zelllysaten	22
3.7	<i>Westernblot</i>	22
3.7.1	SDS-Protein-Gelelektrophorese	22
3.7.2	Proteintransfer	23
3.7.3	Proteinnachweis mit spezifischen Antikörpern.....	23
3.8	Deckgläschen-Fluoreszenzfärbung	23
3.9	Statistische Auswertung	24
4	Ergebnisse	25
4.1	Basalexpression von Galektin-3 in HPDE- und PDAC-Zelllinien	25
4.2	Der Einfluss von Galektin-3 auf das Migrationsverhalten von PDAC-Zellen.....	25
4.2.1	<i>Knockdown</i> von Galektin-3 reduziert die Migrationsfähigkeit von PDAC-Zellen nicht.	25
4.2.2	Pflanzliche Polysaccharide vermindern die Migrationsfähigkeit von PancTu1- und Panc1-Zellen nicht.	30
4.3	Die Bedeutung von Galektin-3 bei der Adhäsion von PDAC-Zellen an Leberendothelzellen	32
4.3.1	Basalexpression von Galektin-3 in der Leberendothelzelllinie TMNK-1	32
4.3.2	<i>Knockdown</i> von Galektin-3 führt zu einer verminderten Adhäsion von PDAC- Zellen an Leberendothelzellen.	32
4.3.3	Kurzzeit-Inkubation mit pflanzlichen Polysacchariden bewirkt eine reduzierte Adhäsion von PDAC-Zellen an Leberendothelzellen.	34
4.3.4	Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden nach <i>Knockdown</i> von Galektin-3 führt kaum zu einer zusätzlichen adhäsionsmindernden Wirkung.....	36
4.3.5	Langzeit-Inkubation mit pflanzlichen Polysacchariden fördert die Adhäsion von PancTu1-Zellen an Leberendothelzellen.	37
4.3.6	Effekte der Langzeit-Inkubation mit pflanzlichen Polysacchariden auf die Galektin-3 vermittelte Signaltransduktion.	38
5	Diskussion.....	43
5.1	Die Bedeutung von Galektin-3 für die Migration von PDAC-Zellen.....	43
5.2	Die Bedeutung von Galektin-3 für die Adhäsion von PDAC-Zellen an Leberendothelzellen	45
5.3	Die Wirkung pflanzlicher Polysaccharide auf das Adhäsionspotenzial der PDAC-Zellen an Leberendothel und die Galektin-3-vermittelte Signaltransduktion.....	49
5.4	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	53
6	Zusammenfassung.....	55
7	Literaturverzeichnis.....	57

8	Anhang	64
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	64
8.2	Abbildungsverzeichnis	66
8.3	Sonstiges	67
9	Danksagung	68
10	Veröffentlichungen.....	68

1 Einleitung

1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Pathogenese

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) stellt weltweit eine der Krebserkrankungen mit der schlechtesten Prognose dar, deren 5-Jahres-Überlebensrate bei 5-7 % liegt. Das mittlere Alter bei Erst-diagnose beträgt 71 Jahre [1]. Laut „*World Cancer Report 2014*“ der *International Agency for Research on Cancer* der *World Health Organization* erkrankten 2012 weltweit schätzungsweise 338.000 Menschen neu an bösartigen Erkrankungen des Pankreas. Davon traten 68 % der Fälle in Ländern mit hohem oder sehr hohem Entwicklungsstand auf. Mit 330.000 Todesfällen im Jahr 2012 stellten bösartige Erkrankungen des Pankreas die siebthäufigste krebbsbedingte Todesursache weltweit dar [2]. In Deutschland lag die Inzidenzrate im Jahr 2013 für Frauen bei 10,4 und für Männer bei 14,3 pro 100.000 Einwohner. Im selben Jahr betrug die 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland 9 % [3].

Ein wesentliches Problem bei der Therapie des PDAC liegt im späten Zeitpunkt der Diagnosestellung, da die Erkrankten anfangs häufig eine unspezifische Symptomatik mit Beschwerden wie Gewichtsverlust, starken abdominellen oder dorsalen Schmerzen und Ikterus zeigen. Bei der Erstdiagnose liegt bei 80 % der Betroffenen eine bereits lokoregionär fortgeschrittene oder fernmetastasierte Erkrankung vor. Metastasen finden sich am häufigsten in der Leber [4] sowie häufig in Lymphknoten, Peritoneum und Lungen [1, 5-7]. Zudem finden Gefäßinfiltration und die Verbreitung von Mikrometastasen bereits früh im Krankheitsverlauf statt [5].

Trotz langjähriger und intensiver Forschung gibt es nach wie vor keine effektive zielgerichtete Therapie, die die durchschnittliche Lebenserwartung nach Diagnose auf mehr als ein Jahr steigern kann [1, 5]. Zudem erweist sich das PDAC bislang als resistent gegenüber Immuntherapie-Konzepten, wie beispielsweise Immuncheckpoint-Inhibitoren [8]. Längerfristiges Überleben kann bislang lediglich durch eine vollständige Resektion erreicht werden, wobei bei diesen Erkrankten ebenfalls mit hoher Wahrscheinlichkeit lokale Rezidive oder Metastasen auftreten [1, 5]. Als adjuvante Chemotherapie nach R0-Resektion werden die Protokolle Gemcitabin oder 5-Fluorurazil/ Folinsäure über eine Dauer von sechs Monaten angewendet [9]. In lokal fortgeschrittenem oder fernmetastasiertem Krankheitsstadium kommen zurzeit die palliativen Chemotherapie-Regime Gemcitabin-Monotherapie [9], „FOLFIRINOX“ (5-Fluorurazil, Irinotecan und Oxaliplatin) [1, 9] bzw. Gemcitabin plus nab-Paclitaxel [1] zum Einsatz. Dadurch wird eine mittlere Gesamtüberlebensrate von 11,1 Monaten mit Folfirinox und von 8,5 Monaten mit Gemcitabin plus nab-Paclitaxel erreicht [1].

Bislang ist kein Biomarker für ein Screening der asymptomatischen Normalbevölkerung auf ein PDAC etabliert [9]. *Carbohydrate antigen 19-9* (CA 19-9) im Serum kann als prognostischer Marker verwendet werden, liefert aber keinen ausreichenden positiven prädiktiven Wert für den Einsatz im Screening [1]. Auch die Detektion von *carcinoembryonic antigen* (CEA) im Serum ist nicht ausreichend spezifisch [5, 10]. Weder bildgebende Methoden wie Endosonographie, endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) oder Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) noch molekularbiologische Methoden werden bisher in Deutschland für das Screening der Normalbevölkerung empfohlen [9].

Ein detaillierteres Verständnis der Pathogenese des PDAC ist daher dringend notwendig, um die Erkrankung einerseits früher erkennen [1, 5, 10, 11] und um andererseits das Auswachsen von Metastasen verhindern sowie bereits vorhandene Metastasen wirksam behandeln zu können [5, 12].

1.1.2 Metastasierungskaskade und Prozesse der Metastasierung

Mechanismen, die zur Tumorentstehung und Metastasierung führen, wurden 2011 von Hanahan und Weinberg [13] zusammenfassend als „*Hallmarks of cancer*“ beschrieben. Danach erwerben epitheliale Zellen wie die des Pankreasgangepithels zunächst im Rahmen der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) einen invasiven Phänotyp. Die Zellen widerstehen zudem der Apoptose, durchwandern die epitheliale Basalmembran und erreichen die Blutzirkulation. Dieser Prozess wird als Intravasation bezeichnet [13] und setzt die Loslösung aus dem epithelialen Zellverband voraus [14].

Die Krebszellen befinden sich im Blutstrom, bis sie durch Gefäßwände extravadieren und in vom Primärtumor entfernt liegende Gewebe einwandern. Bei erfolgreicher Anpassung an die neue Mikroumgebung kommt es in der Folge zum Auswachsen von Tumorzellkolonien, die sich schließlich zu klinisch erkennbaren Metastasen entwickeln können [15, 16].

Eine alternative Form zur Migration von Einzelzellen stellt die kollektive Migration von Tumorzellverbänden dar. Dabei handelt es sich entweder um einen von der EMT unabhängigen Prozess oder es kommt in Teilen des Tumorzellverbands, den „*leader cells*“, die mit dem angrenzenden Gewebe im Kontakt stehen, zu Veränderungen im Sinne der EMT. Für die These der kollektiven Migration spricht die häufige zelluläre Heterogenität von metastatischen Kolonien [15, 17]. Dass gruppierte zirkulierende Tumorzellen (auch als „Tumorzell-Aggregate“ oder „zirkulierende Tumor-Mikroemboli“ bezeichnet) im peripheren Blut von Tumorpatienten nachgewiesen wurden [17-19] und dass es in Tumorsektaten selten zur Identifikation invasiver Einzelzellen kommt, wirft laut Friedl et al. [17] die Frage auf, ob EMT für eine Metastasierung überhaupt notwendig ist oder ob sie lediglich übergangsweise

stattfindet und es anschließend wiederum zur Mesenchymalen-Epithelialen-Transition im Zweitorgan kommt (vergleiche auch: [19]).

Auf zellulärer Ebene beschrieben unter anderen Friedl et al. 2011 [14] fünf Schritte der Einzelzell-Migration. Diese beginnt zunächst mit einer Protrusion der Zelle durch Remodellierung des Zytoskeletts, genauer einer Polymerisierung von Aktin (Schritt 1). An der Regulation dieses Schritts soll das Guanosin-Triphosphat hydrolysierende Enzym (GTPase) Rac beteiligt sein. Darauf folgt die Adhäsion an die Extrazellulärmatrix (EZM) über Zelloberflächenrezeptoren, was darüber hinaus die intrazelluläre Signaltransduktion beeinflusst (Schritt 2). Schritt 3 beschreibt die fokussierte Proteolyse, die das umgebende Gewebe verändert und eine Invasion ermöglicht. Es folgt die durch Aktomyosin vermittelte zelluläre Kontraktion (Schritt 4). Schließlich kommt es zur allmählichen Lösung der adhäsiven Zellkontakte an dem der Protrusion gegenüberliegenden Zellpol (Schritt 5).

Bei der kollektiven Migration übernehmen die „*leader cells*“ die proteolytische Spaltung von Elementen der Extrazellulärmatrix. Dies ebnet nachfolgenden Zellen den Weg, die wiederum durch Proteolyse und mechanische Kräfte Platz für die kollektive Wanderung schaffen. Koordiniert werden die Zellen des Verbandes mithilfe interzellulärer Kontakte [14].

Zusammenfassend sollten Migrationsprozesse von Tumorzellen als dynamisches Geschehen betrachtet werden, in dem Zellen ihre molekulare Charakteristik und ihr Migrationsverhalten ändern sowie Zwischenstadien innehaben können [14].

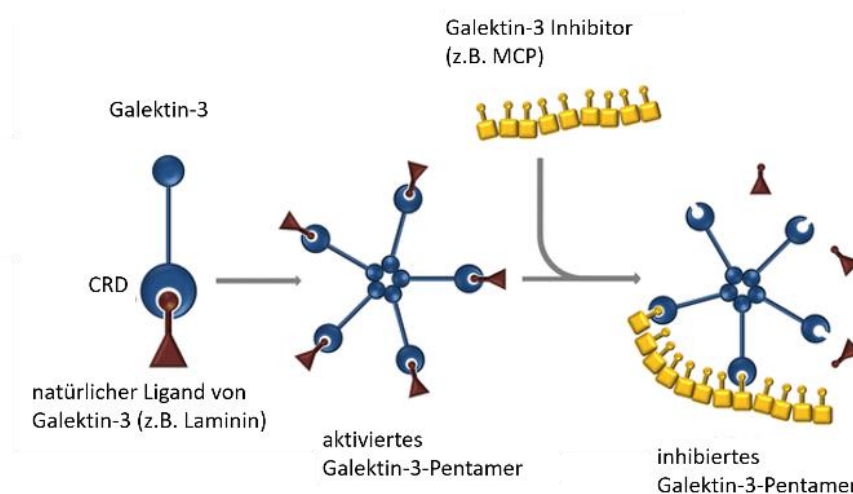
1.2 Galektine

1.2.1 Vorkommen und Funktionen

Galektine gehören in die Proteinfamilie der Lektine, die β -Galaktose binden können und diverse biologische Funktionen ausüben. Bislang sind bei Säugetieren 15 verschiedene Galektine bekannt. Sie werden von verschiedensten Geweben exprimiert und kommen sowohl intra- wie extrazellulär vor. Abhängig von ihrem Expressionsniveau und ihrer Lokalisation sind Galektine an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt, darunter die Modulierung von Mitose, Apoptose und Zellzyklus, der interzellulären Adhäsion, der Adhäsion an extrazelluläre Matrices, aber auch pathologischen Prozessen wie der Dysregulation des Zellwachstums, der malignen Transformation, Entzündungen [20, 21], Apoptose-Resistenz, Induktion der Angiogenese und *Immune-Escape*-Mechanismen [22]. Dabei interagieren die Galektine mit Proteinen oder Kohlenhydraten und beeinflussen auf diese Weise Signalwege und die Proteinexpression [21].

1.2.2 Galektin-3 – Aufbau und Funktionen

Galektin-3 ist als einziges Galektin *chimär* und besteht aus drei Domänen: einer Aminogruppe, einer Kollagen- α -ähnlichen Sequenz und einer Bindestelle für β -Galaktosidasen, der sogenannten „*Carbohydrate-recognition domain*“ (CRD) [23]. Über die CRD sind Interaktionen mit Glykoproteinen und -lipiden möglich. Kommt es hier zu einer Bindung, können in der Folge weitere Galektin-3-Monomere an die Aminogruppe gebunden werden, sodass ein Pentamer entsteht. Mit allen freien CRD-Domänen können Glykoproteine und -lipide interagieren. Auf diese Weise werden Zellen miteinander vernetzt [20] (**Abb. 1.1**). Die Pentamerisierung stellt die Aktivierung von Galektin-3 dar und ist für die Zell-Vernetzung notwendig [24].



1.1: Galektin-3-Struktur, Pentamerisierung und Hemmung [25]:

Galektin-3-Monomere fusionieren nach Aktivierung durch Liganden-Bindung an die CRD zu Pentameren, die der Vernetzung von Zellen und Extrazellulärmatrix (EZM) dienen können. Eine Inhibition von Galektin-3 ist beispielsweise mittels Einsatz von Modifiziertem Zitruspektin (MCP) möglich.

Für Galektin-3 ist eine Beteiligung an Zelladhäsion, -aktivierung, Chemotaxis, Zellwachstum und -differenzierung sowie an der Regulation von Zellzyklus, Apoptose und Angiogenese beschrieben. Darüber hinaus kommt es bei soliden Tumoren und malignen hämatologischen Erkrankungen häufig zu einer Überexpression [20].

Modifiziertes Zitruspektin (MCP) ist bereits als spezifischer Inhibitor von Galektin-3 bekannt [26, 27]. Diese Wirkung beruht auf einer Antagonisierung der β -Galaktose-Bindungsstellen des Galektins [26] (**Abb. 1.1**). Darüber hinaus besitzt Laktose ein Galektin-3 hemmendes Potenzial [23, 28] und wird daher in *in vitro*-Assays als Positivkontrolle verwendet [28].

1.2.3 Galektin-3 im PDAC

Im Vergleich zum angrenzenden, peritumoralen Gewebe ist die Expression von Galektin-3 im PDAC erhöht, wie Untersuchungen von reseziertem Tumorgewebe ergaben [10, 29, 30]. Daraus wurde geschlossen, dass die Expression von Galektin-3 während der Karzinogenese vom physiologischen Pankreasgangepithel über eine chronische Pankreatitis zum PDAC zunimmt [30]. Uneinigkeit herrscht allerdings im Hinblick auf die Unterschiede in der Galektin-3-Expression verschieden differenzierter PDAC-Gewebe: Xie et al. [10] stellten eine erhöhte Expression bei schlecht differenzierten Geweben fest, wohingegen Shimamura et al. [31] eine überwiegend erhöhte Expression in gut differenziertem und eine geringe Expression in schlecht differenziertem Gewebe nachwiesen. Im Gegensatz dazu stellten Berberat et al. 2001 [32], Schaffert et al. 1998 [33] und Gaida et al. 2011 [34] keine Korrelation zwischen der Intensität der Galektin-3-Expression sowie dem Verteilungsmuster und klinischen oder pathohistologischen Parametern fest. Sie identifizierten mittels immunhistologischer Färbungen von PDAC-Geweben das Zytoplasma der Tumorzellen, Tumor-infiltrierende Makrophagen und Tumor-infiltrierende Lymphozyten als Lokalisationen hoher Galektin-3-Konzentration. Zusätzlich konnte teilweise eine membranöse oder nukleäre Expression von Galektin-3 detektiert werden [34]. Auch die Serum-Konzentration von Galektin-3 wird kontrovers diskutiert: Xie et al. [10] konnten einen erhöhten Galektin-3-Spiegel im Serum von PDAC-Patienten im Vergleich zu Patienten mit benignen Erkrankungen des Pankreas und gesunden Probanden nachweisen, während Gaida et al. [34] nur bei einem Teil der untersuchten Seren von PDAC-Patienten erhöhte Galektin-3-Spiegel feststellten und die Serum-Galektin-3-Konzentration als nicht mit klinischen und pathologischen Parametern korreliert beschrieben. Gonnermann et al. [35] stellten keine Differenz der Serum-Galektin-3-Konzentration zwischen PDAC-Patienten und gesunden Probanden fest.

1.2.4 Galektin-3 bei Adhäsions- und Migrationsprozessen

Wie in Absatz 1.1.2 beschrieben, setzt die Fähigkeit zur Migration voraus, dass Zellen ihre interzellulären Kontakte lösen und sich von ihrem Zellverbund entfernen können [14]. Umgekehrt erfordert die Adhäsion, beispielsweise an Endothelzellen anderer Organe, die Bildung neuer interzellulärer Kontakte. Galektin-3 vermittelt sowohl homo- als auch heterotypische Aggregation, d.h. die Anlagerung gleicher Zelltypen (homotypisch) sowie verschiedener Zelltypen beziehungsweise die Anlagerung von Zellen an die EZM (heterotypisch) [23]. Durch die Interaktion von extrazellulärem, oberflächen-assoziiertem Galektin-3 mit der EZM können sich Tumorzellen aus dem Verband des Primärtumors lösen [36]. Homotypische Aggregation über Galektin-3 wurde bereits bei migrierenden Melanom-Zellen [23, 37] sowie Mammakarzinom-Zellen [38] nachgewiesen. Die Beteiligung von Galektin-3 an der hetero-

typischen Aggregation konnte für prämaligne Mamma-Epithelzellen [23, 39], humanen Mammakarzinom- [38, 40, 41], Kolonkarzinom- [41], Prostatakarzinom- und Lungenkarzinom-Zellen [42] bei Interaktion mit humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC-Zellen) gezeigt werden.

1.2.5 Galektin-3 – Mechanismen der Interaktion

Für Galektin-3 sind diverse Glykoproteine und -lipide als Bindungspartner beschrieben. Darunter sind die für Adhäsionsvorgänge bedeutenden Bestandteile der EZM wie z.B. Fibronektin, Kollagen IV, Elastin, Laminin, Hensin [20, 23], die im Kontext von Neuronen beschriebenen Glykoproteine L1 und N-CAM, das Myelin-assoziierte Glykoprotein MAG sowie NCA-160 (CD66) auf der Oberfläche von humanen Neutrophilen [43].

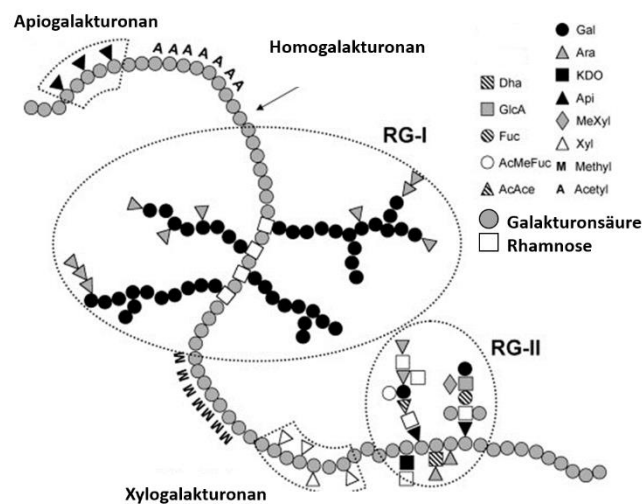
Die Interaktion von Galektin-3 mit Mucin 1 (MUC1), vermittelt durch das onkofetale Thomsen-Friedenreich-Kohlenhydrat (TF-Antigen), bewirkte in Kolonkarzinom- und Melanom-Zelllinien eine Zunahme der homo- und heterotypischen Adhäsion der Tumorzellen. Erklärt wird dieser Effekt durch eine durch die Interaktion ausgelöste Polarisierung der MUC1-Verteilung auf der Zelloberfläche und eine nachfolgende Freilegung kleinerer Zelloberflächen-Rezeptoren [20, 44]. Auf diese Weise werden Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und umgebendem Stroma gefördert, was eine verstärkte Adhäsion an Endothelzellen und Invasion zur Folge hat [20].

Davon abgesehen bewirkt eine erhöhte Konzentration von zirkulierendem Galektin-3 bei humanen pulmonalen Endothelzellen eine Sekretion von verschiedenen Zytokinen wie z.B. Interleukin 6 (IL-6), *Granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) oder *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) [20, 45]. Es ergab sich eine dosis- und zeitabhängige positive Korrelation der Galektin-3-Konzentration (getestet bis 2 µg/ml) mit der Konzentration der sezernierten Zytokine. Diese führten ihrerseits zu einer vermehrten Präsenz von Zelloberflächenrezeptoren auf den Endothelzellen und damit zu einer verstärkten Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel [45].

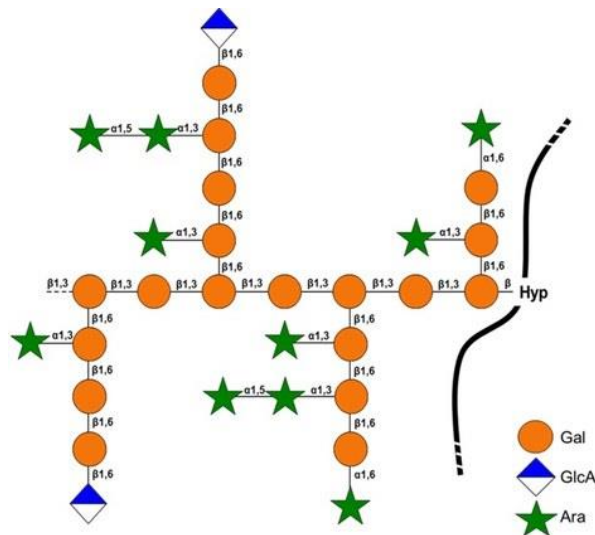
Vascular endothelial growth factor (VEGF)- und *basic fibroblast growth factor* (bFGF)-assoziierte Signalwege werden durch die Bindung von Galektin-3 an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin aktiviert, zeigen pro-angiogenetische Wirkungen und führen zur Phosphorylierung von *focal adhesion kinase* (FAK) [20] und Rac1 [23]. FAK reguliert wiederum Integrin-abhängige Signalwege und das Migrationsverhalten von Endothelzellen, während Rac1 am Umbau des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist [23]. An den *vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGFR-2) kann Galektin-3 ebenso direkt binden [20, 23], wodurch der Rezeptor an der Zelloberfläche verbleibt [23].

1.3 Pflanzliche Polysaccharide zur Hemmung von Galektin-3

Wie unter Punkt 1.2.2 beschrieben, ist *Modifiziertes Zitruspektin* (MCP) als spezifischer Inhibitor von Galektin-3 bekannt [26, 27]. Die in dieser Arbeit zur Hemmung von Galektin-3 verwendeten pflanzlichen Polysaccharide MCP (**Abb. 1.2A**) und *Arabinogalaktan der Echinacea purpurea* (AGP-EPP) (**Abb. 1.2B**) enthalten hohe Anteile an β -Galaktose [26, 46]. Modifiziertes Zitruspektin lag zusätzlich in mit Pektinase prozessierter Form (MCP-Pek) vor. Das Arabinogalaktan wurde, abgesehen von seiner ursprünglichen Form, mit Trifluoressigsäure (AGP-TFA) prozessiert eingesetzt. Alle Substanzen, die in dieser Arbeit zur Hemmung von Galektin-3 eingesetzt wurden, wurden im Labor von Frau Prof. Dr. Birgit Classen, Institut für Pharmazie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, hergestellt und zur Verfügung gestellt.



1.2A: Schematische Struktur des Modifizierten Zitruspektins [Abbildung nach Perez et al. [47]]: Homogalakturonan-Rückgrat aus Galakturonsäure- und Rhamnose-Gruppen.



1.2B: Strukturvorschlag für Arabinogalaktan aus *Echinacea purpurea* [Abbildung zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Birgit Classen, Institut für Pharmazie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel]: Arabinogalaktan mit einem Molekulargewicht von 186 kDa enthält ein Grundgerüst aus Galaktose (Gal) sowie Glukuronsäure- (GlcA) und Arabinose- (Ara) Gruppen. Durch Behandlung mit Trifluoressigsäure werden die Arabinose-Gruppen entfernt, sodass sich das Molekulargewicht auf 68 kDa verringert.

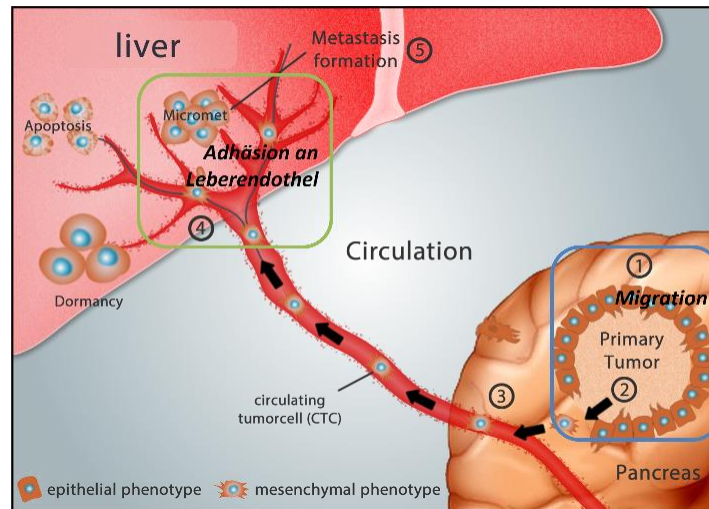
1.4 Ziel der Arbeit

Nach wie vor sind die Mechanismen der Entstehung und Verbreitung von Metastasen beim PDAC unzureichend verstanden. Dies ist jedoch die Voraussetzung für therapeutische Ansätze, um vorhandene Metastasen gezielt bekämpfen sowie das Auswachsen von Mikrometastasen hemmen zu können. Die Suche nach und das therapeutische *Targeting* von potenziell infrage kommenden Zielstrukturen – wie möglicherweise Galektin-3 – sind daher von immenser Bedeutung. Denkbar wäre prinzipiell auch der Einsatz geeigneter Zielmoleküle zu Zwecken des Screenings, beispielsweise als radioaktiv markierte Tracer (vgl. auch Cornelissen et al. [48]).

Es wurde bereits die Expression von Galektin-3 in Resektaten von humanen PDAC-Primärtumoren, lokoregionären Mikro- und Lymphknotenmetastasen beziehungsweise das Vorkommen im Serum nachgewiesen [10, 30-32]. Außerdem wurde die Rolle von Galektin-3 in Prozessen der Migration und/ oder Invasion bei diversen Tumorentitäten wie Mammakarzinom, Melanom, pulmonalem Plattenepithelkarzinom, Sarkomen, gastrischem Adenokarzinom, chronischer myeloischer Leukämie *in vitro* identifiziert [20]. Auch bei PDAC-Zellen konnte bereits eine Rolle von Galektin-3 in der Proliferation und Invasion aufgezeigt werden [30].

Studien zur Evaluierung der Bedeutung von Galektin-3 in der Adhäsion und Migration von PDAC-Zellen fehlen jedoch nach wie vor. Da die Leber das Hauptmetastasierungsorgan des PDAC darstellt, war es

Ziel dieser Arbeit, die Bedeutung von Galektin-3 für die metastasierungs-assoziierten Prozesse der Migration und Adhäsion (vgl. **Abb. 1.3**) an Leberendothelzellen näher zu untersuchen. Zusätzlich dazu sollte das Inhibitions Potenzial von pflanzlichen Polysacchariden auf diese Prozesse eruiert werden.



1.3: Prinzip der Metastasierung des PDAC in die Leber (nach: Lenk, L. [49]): Die Prozesse der Metastasierung umfassen unter anderen die Loslösung von Tumorzellen aus dem Primärkontext, die Migration durch die Blutzirkulation und die Adhäsion an das Endothel vom Primarius entfernt liegender Organe wie das Endothel der Leber.

2 Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, DE
2-Propanol	Th. Geyer GmbH, Renningen, DE
6-Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich, München, DE
Accutase-Lösung	Sigma-Aldrich, München, DE
Ammonium Persulfat (APS)	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg, DE
Bromphenolblau ACS Reagenz	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)	BioLegend, Koblenz, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, DE
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) Medium, 4,5 g/L Glukose	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Essigsäure, 100 %	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Ethanol, rein	Th. Geyer GmbH, Renningen, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Th. Geyer GmbH, Renningen, DE
FluorSave Reagenz	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN-Biotech, Aidenbach, DE
Glycerol 80 %	Sigma-Aldrich, München, DE
HiPerfect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden, DE
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, München, DE
Kollagen aus Rattenschwanz-Knorpel	Roche, Mannheim, DE
Laktose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
L-Glutamin	Bio-West, Nuailé, F
Methanol	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumazid	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natrium-dodecyl-sulfat (SDS) ultra-pure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumpyruvat 100 mM	Biochrom, Berlin, DE
Opti-MEM® reduced serum medium	Thermo Scientific, Schwerte, DE
PageRuler Plus prestained protein ladder	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640-Medium, 20 g/L NaHCO ₃ , ohne L-Glutamin, niedriges Endotoxin	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Rotiphorese Gel 40 (37,5:1) Acrylamid/Bisacrylamid 40 % Lösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Rotisolv® LC-MS-Grade Wasser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Trisbase	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, DE
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, AT
Tween 20	Sigma-Aldrich, München, DE

2.2 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
<i>Westernblot</i>	
Beladungs-Farbstoff (4x)	0,005 % (w/v) Bromphenolblau 2,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol in Laemmli Puffer (2x)
Blot Puffer A	300 mM Trisbase 20 % (v/v) Methanol pH 11
Blot Puffer B	25 mM Trisbase 20 % (v/v) Methanol pH 10,6
Blot Puffer C	25 mM Trisbase 20 % (v/v) Methanol 38 mM Aminocaprinsäure pH 10,6
Blotto	5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
Lämmli Puffer (2x)	128 mM Trisbase 4,6 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerol pH 7,6
Sammelgel-Puffer	0,5 M Trisbase 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8
TBS	2 mM Trisbase 14 mM NaCl pH 7,6
TBS-Tween (TBS-T)	0,05 % Tween 20 in TBS
Trenngel-Puffer	1,5 M Trisbase 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8
<i>Westernblot</i> -Laufpuffer	25 mM Trisbase 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS in ddH ₂ O

Kits	
Clarity™ Western ECL Substrat	Bio-Rad Laboratories, München, DE
DC™ Proteinassay	Bio-Rad Laboratories, München, DE

2.3 Zellkultur-Material

2.3.1 Zelllinien

Zelllinie	Information	Quelle	Referenz
TMNK-1	humane Leberendothelzellen, immortalisiert mittels SV40T und hTERT	JCRB Cell Bank, Japan, P20 JCRB1564 vom 03/04/2014	[50]

Panc1	humane PDAC-Zellen, isoliert aus PDAC-Primärtumor, k-ras- und p53-Mutationen, p16-Deletion	<i>American Type Culture Collection</i> = ATCC	[51-53]
PancTu1	humane PDAC-Zellen, isoliert aus PDAC-Primärtumor, k-ras-, p53- und p16-Mutationen	zur Verfügung gestellt von Dr. C. Röder, Institut für Experimentelle Tumorforschung, Kiel	[51, 53, 54]
H6c7-pBp	humane Pankreasgangepithel-Zelllinie HPDE-E6E7, immortalisiert mittels HPV16-E6E7, transfiziert mit leerem pBabepuro-Vektor (benigne)	zur Verfügung gestellt von Dr. Ming-Sound Tsao, Institut für Pathologie, <i>Montreal General Hospital</i> , Montreal, Kanada	[55]
H6c7-kras	humane Pankreasgangepithel-Zelllinie HPDE-E6E7, immortalisiert mittels HPV16-E6E7, transfiziert mit dem retroviralen Vektor pBabepuro-K-ras4BG12V, Puromycin-resistent (prämaligne)		
Colo357	humane PDAC-Zellen, isoliert aus Lymphknotenmetastase, kras- und DPC4/smad4-Mutationen	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Holger Kalthoff, Institut für Experimentelle Tumorforschung, Kiel	[51]
Panc89	humane PDAC-Zellen, isoliert aus Lymphknotenmetastase, kras- (divergierende Angaben hierzu in der Literatur), p53- und p16-Mutationen	zur Verfügung gestellt von T. Okabe, <i>Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Japan</i>	[51]

2.3.2 Kultur-Medien

Zelllinie	Kulturmedium
Colo357, Panc1, Panc89, PancTu1	RPMI 1640 Medium + 10 % FCS + 1 % L-Glutamin + 1% Natriumpyruvat
H6c7-pBp, H6c7-kras	RPMI 1640 Medium + Keratinozytenmedium (1:1) + 5 % FCS + 0,5 % L-Glutamin + 5 ng/ml <i>Epidermal Growth Factor</i> (EGF) + 50 µg/ml Rinderhypophysenextrakt
TMNK-1	Dulbecco's MEM + 10 % FCS + 1 % L-Glutamin + 1 % Penicillin-Streptomycin
<i>Adhäsionsassay</i>	siehe Panc1, PancTu1
<i>Migrationsassay</i>	RPMI 1640 Medium + 1 % FCS + 1 % L-Glutamin + 1 % Natriumpyruvat

2.4 Molekularbiologisches Material

2.4.1 *Small interfering RNA*

siRNA	Stock-Konzentration	Hersteller
Control siRNA-A sc-37007	10 µM	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
Galectin-3 siRNA (h) sc-155994	10 µM	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE

2.5 Pflanzliche Polysaccharide

Polysaccharid	Quelle	Stock-Konzentration
Arabinogalaktan (AGP-EPP)	prozessiert und zur Verfügung gestellt von Prof. B. Classen, Institut für Pharmazie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel	1 mg/ml
Arabinogalaktan, prozessiert mit Trifluoressigsäure (AGP-TFA)		1 mg/ml
Fluorescein-Arabinogalaktan (FITC-AGP)		1 mg/ml
Modifiziertes Zitruspektin (MCP)		1 mg/ml
Modifiziertes Zitruspektin, prozessiert mit Pektinase (MCP-Pek)		1 mg/ml

2.6 Antikörper

Spezifität [Klon/Produktnummer]	Erwartetes Molekulargewicht [kDa]	Spezies/Isotyp	Konzentration der Stammlösung [Bestellnummer]	Verdünnung (Westernblot)	Hersteller
Primärantikörper					
AKT [polyklonal]	60	<i>rabbit (rb)</i>	34 µg/ml	1:1000 in BSA	Cell Signaling, Frankfurt, DE
cJun [polyklonal]	43/48	<i>rb</i>	k.A. (#9162)	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt, DE
FOXO1 [polyklonal]	70-80	<i>rb</i>	300 µg/ml	1:1000	Proteintech, Manchester, UK
FOXO3 [1F12D11]	85-90 (manchmal 90/40)	<i>mouse (m)</i>	1 µg/µl	1:1000	Proteintech, Manchester, UK
Gal3 [Gal397]	30-32	<i>m</i>	0,5 mg/ml	1:1000	BioLegend, Koblenz, DE
Gal3 Alexa Fluor®647 [M3/38]		<i>rat IgG2a</i>	0,5 mg/ml	1:50 [IF]	BioLegend, Koblenz, DE
GSK-3β [27C10]	46	<i>rb</i>	k.A. [#9315]	1:1000 in BSA	Cell Signaling, Frankfurt, DE
HSP90 [H-114]	90	<i>m</i>	200 µg/ml	1:2000	Santa Cruz, Heidelberg, DE
P38 [polyklonal]	43	<i>rb</i>	27 µg/ml	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt, DE
p44/42 MAPK (ERK1/2)	42/44	<i>rb</i>	7,6 µg/ml	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt, DE

p-AKT [polyklonal]	60	rb	k.A. [#9271]	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt, DE
p-GSK-3 α / β [polyklonal]	46/51	rb	k.A. [#9331]	1:1000 in BSA	Cell Signaling, Frankfurt, DE
phospho- p44/42 MAPK (ERK1/2)	42/44	rb	150 μ g/ml	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt, DE
p-P38 MAPK [D3F9]	43	rb	33 μ g/ml	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt, DE
Rac1b [polyklonal]	22	rb	1 mg/ml	1:1000	Millipore/ Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, DE
Sekundärantikörper					
Anti-Maus IgG [#7076]			10 mM	1:2000	Cell Signaling, Frankfurt, DE
Anti-Ratte IgG [#7077]			10 mM	1:2000	Cell Signaling, Frankfurt, DE
Antikörper für Isotypenkontrollen					
ISO IgG2a Alexa Fluor®488			0,5 mg/ml		Cell Signaling, Frankfurt, DE

2.7 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
0,05 ml, 1,25 ml, 5,0 ml Ritips®	Ritter, Schwabmünchen, DE
0,1-10 μ l, 10-200 μ l, 100-1000 μ l Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml Safe Seal tubes	Sarstedt, Nümbrecht, DE
12-/ 96-well Flachbodenplatten	Sarstedt, Nümbrecht, DE
15 ml, 50 ml Zentrifugen-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
25 cm ² Zellkultur-Flaschen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
5 ml, 10 ml, 25 ml Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, DE
75 cm ² Zellkultur-Flaschen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
96-well Rundbodenplatten	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Amersham Hybond polyvinylidene fluoride (PVDF) Membran 0,45 μ m	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Histobond Adhäsions-Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
Micro-Touch Nitril Untersuchungshandschuhe	Ansell, Islin, USA
Minisart Syringe Filter 28 mm/0,2 μ m	Sartorius, Göttingen DE
Parafilm M sealing film	Bemis, Oshkosh, USA
Pasteurpipetten ISO 7712	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Röhn, DE
Transferpipetten 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Whatman-3MM Filterpapier FE	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht, DE

2.8 Software

Software	Hersteller
FUSION-CAPT 16.06	Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE
i-control™ Microplate Reader Software	Tecan, Crailsheim, DE
ImageJ 1.46r	National Institutes of Health, Bethesda, USA
LSM image browser	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
Microsoft Office 2013, 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NyOne Software 1.4	SynenTech GmbH, Elmshorn, DE
Sigma Plot 12.5	Systat Software GmbH, Erkrath, DE

2.9 Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
Zentrifugen	
Eppendorf Zentrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Heraeus Multifuge X1	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Heraeus Pico 17	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Rotina 420 R	Hettichlab, Tuttlingen, DE
Sprout® mini-Zentrifuge	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA
Brutschränke	
BBD 6220 CO ₂ Inkubator	Thermo Scientific, Schwerte, DE
HERA Cell 240 Inkubator	Thermo Scientific, Schwerte, DE
QBA1 Tischinkubator	Grant, Cambridge, UK
Stuart SRT9 Rollenmischer	Bibby Scientific Ltd., Stone, UK
W12 Wasserbad	Medingen, Arnsdorf, DE
Messgeräte	
Fusion SL Imager	Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE
Infinite® M200 Pro microplate reader	Tecan, Crailsheim, DE
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
ph 7110 meter	inoLab, Weilheim, DE
Mikroskope	
AE2000	Motic, Wetzlar, DE
BZ-9000 II	Keyence, Osaka, JPN
EVOS XL Core Cell Imaging System	AMG, Bothell, USA
JuLi™ Br04 Cell History Recorder	NanoEnTek, Waltham, USA
NyOne®	Syntech GmbH, Elmshorn, DE
Pipetten	
Finnpipette F1 0,2-2 µl	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette F1 100-1000 µl	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette F1 1-10 µl	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette F1 20-200 µl	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette F1 2-20 µl	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette F1 3-300 µl	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Macro Pipettierhilfe	Brand, Wertheim, DE
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald, DE

Ripette® multistep dispenser	Ritter, Schwabmünchen, DE
Laminar flow-/ Sicherheitswerkbänke	
HERA Safe	Thermo Scientific, Schwerte, DE
HERA Safe KS	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Waagen	
Precisa BJ 2100D	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
Precisa XB 120 ^a	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
Andere Geräte	
Arpege 110 Stickstofftank	AIR LIQUIDE Medical GmbH, Düsseldorf, DE
CS-300V Power supply	Cleaver Scientific, West Sussex, UK
Cutter	Novus Dahle, Lingen, DE
Gefrierkarussell	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen, DE
Gefrierschrank HERAfreeze™ basic (-80 °C)	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Gyrotwister S-1000-B-230 V	Labnet, Edison, USA
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen, DE
Laboport Vakuumpumpe	KNF Neuberger, Freiburg, DE
MR Hei-Mix S Magnetrührer	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
OmniPAGE VS10D gel chamber	Cleaver Scientific, West Sussex, UK
PluriPlex Magnetroller	PluriSelect, Freiburg, DE
SD20 Semi Dry Maxi transfer chamber	Scleaver Scientific, West Sussex, UK
Sonicator Sonopuls	Bandelin, Berlin, DE
Vakuumpumpe	VWR, Radnor, USA
VORTEX GENIUS 3 vortex shaker	IKA-Werke, Staufen, DE

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zelllinien

Als Modell für physiologisches Leberendothel diente die TMNK-1 Zelllinie. Hierbei handelt es sich um eine humane Leberendothel-Zelllinie, für deren Etablierung Leberendothelzellen durch Transduktion von retroviralem Antigen SV40T und hTERT (humane Telomerase reverse Transkriptase) immortalisiert wurden. Die Zelllinie exprimiert Faktor VIII, VEGFR (flt-1 KDR/Flk-1) und CD34, die als Marker für Endothelzellen bekannt sind [50].

Als Modell für benignes Pankreasgangepithel wurde die humane Pankreasgangepithel-Zelllinie H6c7-E6E7 verwendet, die mittels HPV16-E6E7 immortalisiert und mit leerem pBabepuro-Vektor transfiziert wurde [55]. Als Modell für prämalignes Pankreasgangepithel diente die humane Pankreasgangepithel-Zelllinie H6c7-E6E7, die ebenfalls mittels HPV16-E6E7 immortalisiert und mit dem retroviralen Vektor pBabepuro-K-ras4BG12V transfiziert wurde [55].

Als Modell für humane PDAC-Zellen wurden die Zelllinien Panc89, Panc-1 und PancTu-1 verwendet. Panc89 wurde 1983 von T. Okabe et al. [56] aus der Lymphknotenmetastase eines PDAC-Patienten isoliert. Mutationen in den Genen für k-ras (uneinheitliche Angaben), p53 und p16 sind für diese Zelllinie beschrieben [51]. Panc-1 wurde 1975 von M. Lieber et al. [52] etabliert und entstammt dem schlecht differenzierten Primärtumor (G3) eines 56-jährigen PDAC-Patienten. Sie weist Mutationen in den Genen für k-ras und p53 sowie eine homozygote Deletion von p16 auf [51]. PancTu-1 wurde 1982 durch M. von Bülow et al. etabliert und entstammt ebenfalls einem mäßig bis schlecht differenzierten PDAC-Primärtumor (G2-3). Hier wurden ebenfalls Mutationen in den Genen für k-ras, p53 und p16 nachgewiesen [51].

3.1.2 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer *Laminar flow*-Werkbank. Alle Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit 10 ml des jeweiligen Kulturmediums im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relativer Feuchte (rF) kultiviert. Um die Zellen zu passagieren, wurde zuerst unter dem Mikroskop überprüft, ob eine Konfluenz von 80 % des Zellbodens erreicht war. War dies der Fall, wurde das Medium aus den Kulturflaschen mithilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5 ml Trypsin für 10 bis 15 Min (je nach Zelllinie) im Brutschrank inkubiert. Nach Kontrolle der Ablösung am Mikroskop wurden die Zellen in ein 50 ml-Röhrchen überführt und die enzymatische Reaktion mithilfe von 5 ml Kulturmedium abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen 5 Min bei 300 G zentrifugiert, sodass

ein Zellpellet entstand. Der Überstand des Mediums wurde abgesaugt, die Zellen wurden in neuem Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Das Medium wurde auf ein Endvolumen von 10 ml pro Flasche aufgefüllt.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension in die Kammer pipettiert und die intakten Zellen (regelmäßige, intakte Kontur) gezählt. Dabei wurden Zellen am linken und oberen Rand der Quadrate mitgezählt, die rechten und unteren Ränder jedoch ausgelassen. Nach Auszählen der vier Quadrate wurde das Ergebnis durch vier dividiert. Daraus ergab sich die Zellkonzentration in der Einheit $\cdot 10^4/\text{ml}$.

3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zunächst wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, aus den Kulturflaschen abgelöst und pelletiert. Das Zellpellet wurde in 900 µl FCS und 100 µl DMSO aufgenommen und in Kryo-Röhrchen überführt. Diese wurden fest verschlossen und für 24 Stunden in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierkarussell bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Anschließend wurde das Röhrchen für die längere Aufbewahrung bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurde ein Kryo-Röhrchen dem Stickstofftank entnommen, der Schraubverschluss leicht gelöst, um einen Unterdruck zu vermeiden und das Röhrchen für zwei Minuten in den Brutschrank gestellt. Sobald die Zellsuspension sich in einem flüssigen Aggregatzustand befand, wurde sie mit 5 ml erwärmtem Kulturmedium in ein 50 ml-Röhrchen überführt und bei 300 G für 5 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde mithilfe der Vakuumpumpe abgesaugt. Nun konnten die Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche pipettiert werden.

3.2 Transfektion mit siRNA

Um die Expression von Galektin-3 in PDAC-Zellen zu vermindern und auf diese Weise die Bedeutung von Galektin-3 auf das Migrations- und Adhäsionsverhalten der Zellen untersuchen zu können, wurde ein transienter *Knockdown* mittels siRNA durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 12-Well-Platten ausgesät. Für eine 72-stündige Transfektionsdauer wurde die Zellzahl $5 \cdot 10^4/\text{Well}$ in 1 ml Medium gewählt. Am Tag nach der Aussaat wurden für die Transfektion folgende Ansätze hergestellt (Ansatz pro Well bei Einsatz von 2 ml Kulturmedium): 100 µl OptiMEM, 2 µl siRNA (siGal3 bzw. Kontrolle (Ctrl)), 12 µl

Transfektionsreagenz. Die Ansätze wurden 10 Min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums in allen *Wells* auf 2 ml Medium. Pro *Well* wurde nun der jeweilige Transfektions-Ansatz hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 72 Stunden im Brutschrank.

3.3 Charakterisierung des Migrationsverhaltens mittels *Life-Cell-Imager* (JuLi Br)

PDAC-Zellen wurden mit einer Zellzahl von $5 \cdot 10^4$ Zellen/ *Well* ausgesät. Am Folgetag erfolgte die Transfektion mit Kontroll- oder Galektin-3 spezifischer siRNA (siehe Punkt 3.2).

Nach 120 Stunden wurde zunächst die Konfluenz des Zellrasens überprüft. Diese musste zumindest in der Mitte der *Wells* 100 % sein. War dies der Fall, so wurde dem Zellrasen mithilfe einer Pipettenspitze (2-200 μ l) und eines Lineals eine horizontale Wunde zugefügt. Darauf folgte ein Wechsel des Mediums auf 2 ml RPMI-Medium mit 1 % FCS pro *Well*.

Es folgte die Einstellung der Schärfe der mikroskopischen Bilder am JuLi-Br-Mikroskop. Die Parameter wurden solange angepasst, bis das Gerät die Konfluenz des Zellrasens (Abgrenzung Zellen – zellfreie Fläche) realitätsgetreu erkannte. Im Intervall 1 Foto/10 Min erfolgten die Aufnahmen über eine Dauer von 24 Stunden über zwei Kanäle für Test- (Galektin-3 *Knockdown*) bzw. Kontroll- (Kontroll siRNA) Ansatz. Während der Analyse erfolgte die Inkubation bei 37 °C im Brutschrank (siehe Kapitel 3.1.2). Aufgezeichnet wurde zudem die Änderung der Konfluenz in %. Ausgewertet wurde die freie, nicht von Zellen besiedelte Fläche nach o.g. Inkubationszeiten mittels der *ImageJ-Software*. (verwendetes *Macro* siehe Anhang)

3.4 Charakterisierung des Migrationsverhaltens mittels *Wound-healing-Assay*

Zunächst erfolgte die Aussaat der PDAC-Zellen am Vortag des Versuchstages in eine 12-*Well*-Kulturplatte. Hierzu wurden $25 \cdot 10^4$ Panc1-Zellen pro *Well* bzw. $30 \cdot 10^4$ PancTu1-Zellen pro *Well* ausgesät. Nach 24 Stunden wurde die Konfluenz des Zellrasens überprüft. Mittels einer Pipetten-Spitze (2-200 μ l) und mithilfe eines Lineals wurde dem Zellrasen eine horizontale Wunde zugefügt. Anschließend erfolgte ein Wechsel des Mediums auf 2 ml RPMI-Medium mit 1 % FCS pro *Well*, das mit 2 μ l der Arabinogalaktan- bzw. Arabinogalaktanprotein-Lösung angereichert wurde. Die Zielkonzentration betrug dabei 1 μ g/ml. Als Positiv-Kontrolle diente Laktose-Lösung in der Konzentration 342,29 μ g/ml. Die Negativ-Kontrolle blieb unbehandelt. Die automatisierten lichtmikroskopischen Messungen erfolgten nach 0, 8 und 24 Stunden am *NyOne*-Mikroskop. Inkubiert wurden die Versuchsansätze im Brutschrank, wobei die Messzeiten am *NyOne*-Mikroskop bei Raumtemperatur so kurz wie möglich gehalten wurden. Quantitativ ausgewertet wurde die freie, nicht von Zellen besiedelte Fläche nach o.g. Inkubationszeiten mittels der *ImageJ-Software*. (verwendetes *Macro* siehe Anhang)

3.5 Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens mittels *Adhäsionsassay*

Am Vortag des Versuchstages wurden die *Wells* einer 24-*Well*-Kulturplatte mit einer Kollagenlösung der Konzentration 0,15 mg/ml benetzt, worauf 2 Stunden Trocknungszeit bei Raumtemperatur folgten. Die Kollagenbeschichtung diente hierbei als Modell für die EZM. Die TMNK-1-Zellen wurden mittels Accutase abgelöst und je $25 \cdot 10^4$ Zellen pro *Well* in 500 μ l TMNK-1-Medium in ein Kollagen-beschichtetes *Well* ausgesät (siehe **Abb. 3.1**).

Am Versuchstag wurden $5 \cdot 10^6$ PancTu1-Zellen mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) gefärbt. Dafür wurden pro 10^6 Zellen 500 μ l CFSE-Lösung (5 μ M) verwendet. Die CFSE-Lösung wurde wie folgt angesetzt: 4 ml PBS + 4 μ l CSFE-Stammlösung (5 mM).

Die Zellen wurden zunächst mittels Accutase aus den Kulturflaschen abgelöst, anschließend in 10 ml Kulturmedium resuspendiert, gezählt und die gewünschte Zellzahl dem 50 ml-Röhrchen entnommen. Nach 5-minütigem Zentrifugieren wurde der Überstand entfernt. Das Zellpellet (hier 10^6 Zellen) wurde in 500 μ l CFSE-Lösung resuspendiert. Es folgte eine Inkubationszeit von 20 Min im Brutschrank unter Lichtausschluss. Anschließend wurde das fünffache Volumen Kulturmedium hinzugegeben (hier 2,5 ml) und 5 Min bei 300 G zentrifugiert. Der Überstand wurde danach abgesaugt und die Zellen in 500 μ l Kulturmedium resuspendiert.

Für den *Adhäsionsassay* wurden folgende Ansätze vorbereitet:

A) Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens der PDAC-Zellen nach transientem siRNA-vermitteltem *Knockdown* von Galektin-3 (siehe **Abb. 3.1A**): Es erfolgte vor Beginn des *Adhäsionsassay* eine 72-stündige (PancTu-1-Zellen) bzw. 120-stündige (Panc1-Zellen) Transfektion mit siRNA (siehe Abschnitt 3.2). Entsprechend erfolgte die Ablösung der Zellen mittels Accutase aus den *Wells* der Kulturplatte.

1. *Knockdown* von Galektin-3: 1,5 ml Medium (mit $60 \cdot 10^4$ Zellen)
2. Kontroll-*Knockdown*: 1,5 ml Medium (mit $60 \cdot 10^4$ Zellen)

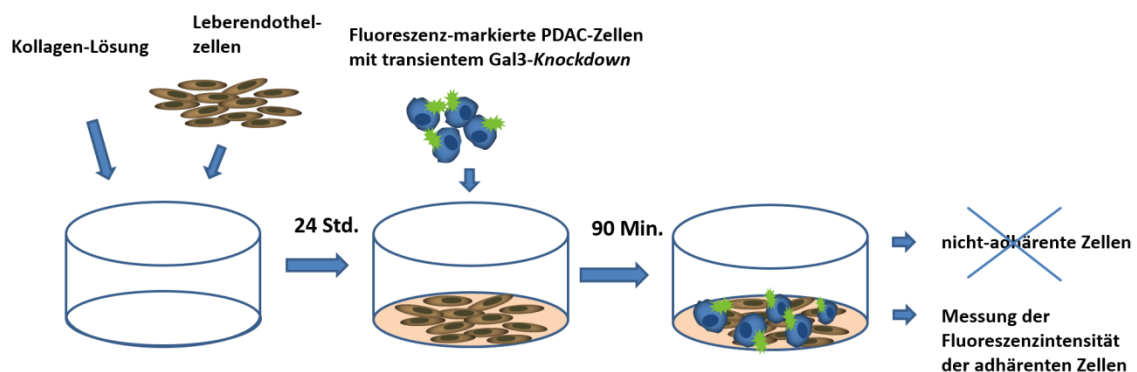
B) Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens der PDAC-Zellen unter Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden (siehe **Abb. 3.1B**):

1. Mit Galektin-3-Inhibitoren: 1,2 ml Medium + 1,5 μ l Arabinogalaktan(protein)-Lösung + 0,3 ml Zellsuspension (mit $60 \cdot 10^4$ Zellen)
2. Positivkontrolle: 1,05 ml Medium + 150 μ l Laktose-Lösung (30 mg/ml) + 0,3 ml Zellsuspension (mit $60 \cdot 10^4$ Zellen)

3. Negativkontrolle: 1,2 ml Medium + 0,3 ml Zellsuspension (mit $60 \cdot 10^4$ Zellen)

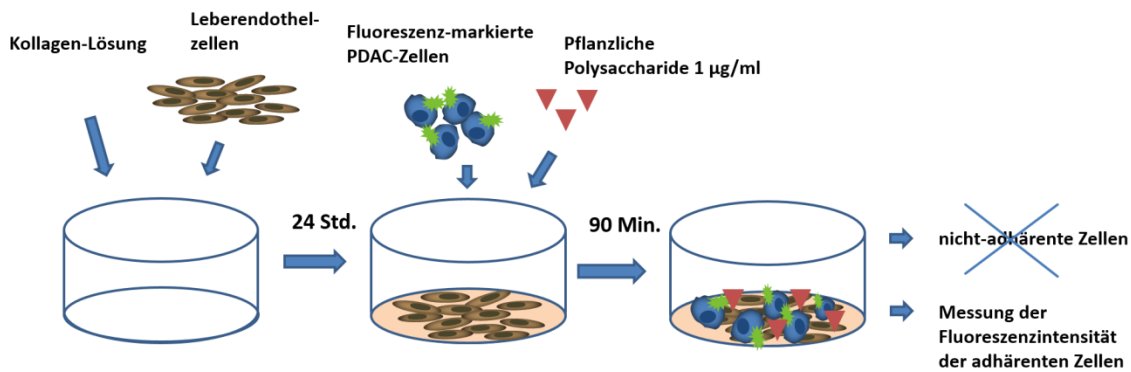
Nach einmaligem Waschen aller *Wells* mit 500 µl PBS wurden 450 µl des jeweiligen Ansatzes auf die TMNK-1-Zellen gegeben. Dies entspricht $18 \cdot 10^4$ Zellen pro *Well*. Jeder Ansatz wurde dreifach ange-setzt. Es folgten 90 Min Inkubationszeit im Brutschrank.

Danach wurde der Überstand jedes *Wells* (mit den nicht adhärenierten Zellen) abgenommen, jedes *Well* dreimal mit 500 µl PBS gewaschen und anschließend wurden 300 µl 1-%-ige Triton-Lösung in jedes *Well* pipettiert. Die Platte wurde 10 Min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur geschüttelt. Je-weils 100 µl des Lysats (das die adhärenierten PDAC-Zellen enthält) wurden in Doppelwerten in eine 96-*Well*-Platte überführt und bei 3300 G 1 Min zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen und im Anschluss die Fluoreszenzintensität der CFSE-gefärbten PDAC-Zellen im Tecan-Fluorometer (Exzitationswellen-länge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 535 nm, 10 Lichtblitze) messen zu können. Die Zelladhäsion wurde mittels Normalisierung der jeweiligen Fluoreszenzintensität auf die unbehandelte Kontrolle nach Subtraktion des PDAC-Zell-freien „blank“-Mittelwertes (TMNK-1-Zellen allein) berechnet. An-fangs (*Adhäsionsassays* mit Panc1-Zellen, siehe Kapitel 4.3.2) erfolgte im Anschluss an die Normalisie-rung auf die unbehandelte Kontrolle zusätzlich eine Normalisierung auf die Zellzahl, die jedoch zu den gleichen Ergebnissen führte und auf die daher im weiteren Verlauf verzichtet wurde.



3.1A: Prinzip des *Adhäsionsassays* mit transientem siRNA-vermitteltem *Knockdown* von Galektin-3:

Die Leberendothelzellen TMNK-1 wurden in Kollagen-beschichtete *Wells* ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Versuchstag wurden Fluoreszenz-markierte PDAC-Zellen nach siRNA-vermitteltem *Knockdown* von Galektin-3 zu den TMNK-1-Zellen gegeben. Die anschließende Inkubationszeit im Brutschrank betrug 90 Minuten. Schließlich wurden die *Wells* dreimal mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente PDAC-Zellen zu entfernen. Zuletzt wurde eine Lyse mittels Triton-Lösung durchgeführt und die Fluoreszenzintensität der adhärenenten Fluoreszenz-markierten PDAC-Zellen im Tecan-Fluorometer ge-messen.



3.1B: Prinzip des *Adhäsionsassays* unter Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden:

Die Leberendothelzellen TMNK-1 wurden in Kollagen-beschichtete *Wells* ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Versuchstag wurden Fluoreszenz-markierte PDAC-Zellen unter Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden zu den TMNK-1-Zellen gegeben. Die anschließende Inkubationszeit im Brutschrank betrug 90 Minuten. Schließlich wurden die *Wells* dreimal mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente PDAC-Zellen zu entfernen. Zuletzt wurde eine Lyse mittels Triton-Lösung durchgeführt und die Fluoreszenzintensität der adhärenenten Fluoreszenz-markierten PDAC-Zellen im Tecan-Fluorometer gemessen.

3.6 Proteingewinnung aus Zelllysaten

Um Ganzzelllysate aus adhärenenten Zellen zu gewinnen, wurde das Medium aus den *Wells* abgesaugt und die *Wells* wurden mit 500 µl PBS gespült. Danach wurden 200 µl Lämmli-Puffer (2-fach konzentriert) pro *Well* hinzugegeben. Mittels eines Zell-Schabers und einer 1 ml-Pipette wurden die Zelllysate in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Anschließend wurden die Lysate dreimal für 1 Sekunde mit *Sonicator*-Ultraschall behandelt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Für die Gewinnung von Ganzzelllysaten aus Zellsuspensionen wurden die Zellen 5 Min bei 1500 G zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet in 500 µl PBS resuspendiert und erneut 5 Min bei 1500 G zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das Pellet in 200 µl Lämmli-Puffer aufgenommen, mit dem *Sonicator*-Ultraschall behandelt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.7 Westernblot

3.7.1 SDS-Protein-Gelelektrophorese

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration in den zu untersuchenden Ganzzelllysaten, wurde den Proben ein entsprechendes Volumen mit 10-12 µg Proteingehalt entnommen und das Volumen der Proben mit 2-fach konzentriertem Lämmli-Puffer angeglichen. Die Proben wurden mit 4-fach konzentriertem Farbpuffer aus Bromphenolblau mit 2,5 % β-Mercaptoethanol versetzt (3 Teile Probe + 1 Teil Farbe). Anschließend wurden die Proben für eine Dauer von 30 Sekunden zentrifugiert,

5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht, auf Eis gestellt, erneut herunterzentrifugiert und auf die zuvor vorbereiteten Gele (10 oder 15%ig) geladen (siehe Abschnitt 2.2). Darauf folgend wurden die Gele bei 90 V laufen gelassen, bis sich die Proben gesammelt hatten. Die Phase des Auftrennens folgte bei 120 V.

3.7.2 Proteintransfer

Für den Proteintransfer vom Gel auf die PVDF-Membran wurde diese zunächst durch eine 1-minütige Inkubation in Methanol permeabilisiert und anschließend dreimal in Wasser gewaschen. Es wurde ein *Semi-Dry*-Verfahren verwendet. Die Schichtung der *Whatman*-Papiere, des Gels sowie der Membran in der Transferkammer erfolgte nach diesem Schema:

Anode (+) → 6 x *Whatman*-Papier mit Puffer A → 3 x *Whatman*-Papier mit Puffer B → PVDF-Membran → SDS-Gel → 6 x *Whatman*-Papier mit Puffer C → Kathode (-)

Der Transfer erfolgte bei 1,25 mA/cm² (hier: 70 mA) pro Gel für 60 Minuten. Danach wurde die Membran 10 Minuten in TBS-T (0,05 % Tween) gewaschen und darauf folgend 1-2 Stunden bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4 °C) in „Blotto“ (TBS-T mit 5 % Magermilchpulver) blockiert. Die Blockierung bei Raumtemperatur erfolgte in Schälchen auf dem Schüttler, die Blockierung bei 4 °C in 50 ml-Röhrchen auf dem Rollenmischer.

3.7.3 Proteinnachweis mit spezifischen Antikörpern

Nach der Blockierung in Blotto wurden die Membranen für 1 Stunde bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4 °C) im Primärantikörper (Konzentration der Antikörper siehe Kapitel 2.6) inkubiert. Dazu wurden die Membranen zurechtgeschnitten und in 50 ml-Röhrchen überführt. Nach der Inkubation wurden die Membranen dreimal für jeweils 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Die Inkubation im Sekundärantikörper (Konzentration 1:2000 in „Blotto“) erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurden die Membranen erneut dreimal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Schließlich erfolgte die Detektion der Protein-Banden nach 5-minütiger Inkubation in Substrat-Lösung (Clarity Western ECL) mittels der Fusion-SL Chemilumineszenz-Dokumentationsanlage.

3.8 Deckgläschen-Fluoreszenzfärbung

Für die Fluoreszenzfärbung von membranständigem Galektin-3 wurden 20*10⁴ PDAC-Zellen in 12-Well-Platten auf Deckgläschen ausgesät.

Für die Färbung wurden am darauffolgenden Tag die *Wells* einmal mit 500 µl PBS-Puffer pro *Well* gewaschen. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Fixierung mit 4,5 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur unter dem Abzug. Alle *Wells* wurden erneut dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Der Blockierung diente die folgende 20-minütige Inkubation mit 4 % BSA/PBS bei Raumtemperatur. Die Deckgläschen wurden einzeln entnommen, wobei überschüssige Lösung mithilfe von Zellstoff abgetupft wurde. Für die folgende Inkubation mit dem Galektin-3-Antikörper wurden pro Deckgläschen 100 µl der angesetzten Antikörperlösung (Galektin-3-Antikörper + 1 % BSA/PBS + Hoechst-Lösung 1:1000) auf eine mit Parafilm belegte Glasplatte in einer Feuchtkammer pipettiert. Die Spezifität der Färbung wurde mittels eines Isotypenantikörpers überprüft, wobei der Antikörper in derselben Konzentration wie der Galektin-3-spezifische Antikörper eingesetzt wurde. Die Hoechst-Lösung diente hierbei der Anfärbung der Zellkerne. Auf diese Lösung wurden die Deckgläschen mit dem Zell-Monolayer in Richtung des Parafilms bläschenfrei gelegt. Inkubiert wurden die Deckgläschen für eine Stunde unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer oder über Nacht bei 4 °C. Abschließend wurden die Deckgläschen erneut zum dreimaligen Waschen mit PBS für jeweils 5 Minuten unter Lichtausschluss in die Kulturplatte überführt, mit *Fluor Save*-Reagenz auf Objektträger aufgebracht und mithilfe von farblosem Nagellack befestigt. Die fotografischen Aufnahmen erfolgten am Keyence-Mikroskop BZ-9000 II bei 200-facher Vergrößerung mit den folgenden Belichtungszeiten: HOECHST (Zellkerne) 1/20 s und AF 647 (Gal3) 1 s.

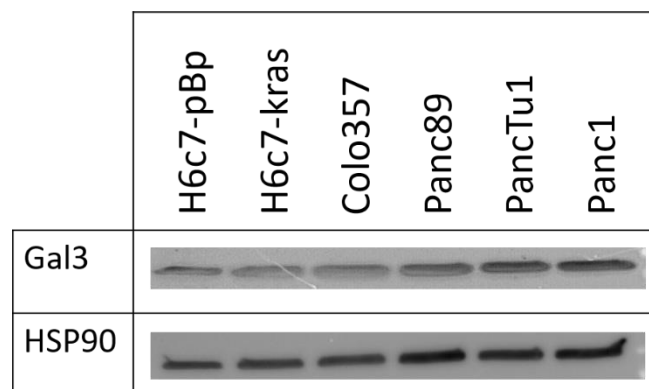
3.9 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde die *Software* Sigma Plot 12.5 verwendet. Auf eine Normalverteilung der Daten wurde mittels Shapiro-Wilk-Test getestet. Normalverteilte Daten wurden mittels *Equal Variance*- und Student's t-Test analysiert. Auf nicht normalverteilte Daten wurde der Test *Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks (ANOVA on Ranks)* angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Basalexpression von Galektin-3 in HPDE- und PDAC-Zelllinien

Zur Charakterisierung der pankreatischen Gangepithel-Zelllinien im Hinblick auf ihre Expression von Galektin-3 wurden Ganzzelllysate angefertigt und diese mittels *Westernblot* analysiert. Hier zeigte sich eine geringe Menge Galektin-3 in der benignen Zelllinie H6c7-pBp, der prämaligen Zelllinie H6c7-kras und der malignen Zelllinie Colo357 (**Abb. 4.1**). Die PDAC-Zelllinien Panc89, PancTu1 und Panc1 wiesen eine moderate bis hohe Galektin-3-Expression auf. Der Befund einer geringen Expression von Galektin-3 in benignen und prämaligen pankreatischen Zelllinien und die im Gegensatz dazu gesteigerte Expression in malignen Varianten deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen Überexpression von Galektin-3 in Pankreaskarzinomen [10, 29, 30]. Da die beiden Zelllinien PancTu1 und Panc1 nicht nur eine deutliche Galektin-3-Expression zeigten, sondern auch bezüglich ihres Adhäsions- und Migrationsverhaltens bereits in anderen Projekten der Arbeitsgruppe charakterisiert waren, wurden diese beiden Zelllinien für die folgenden Untersuchungen ausgewählt.

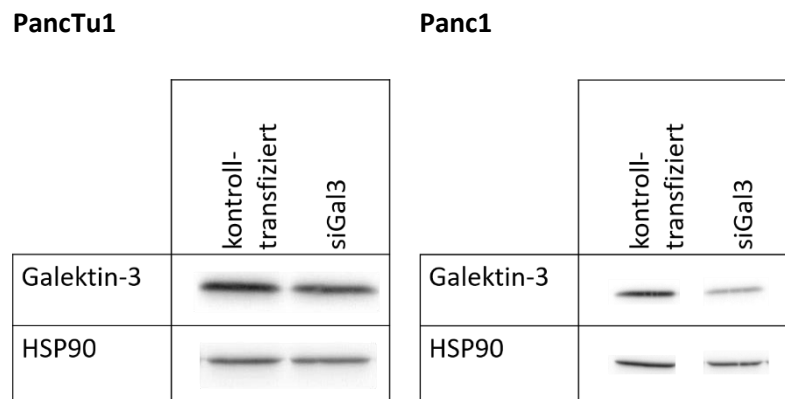


4.1: Moderate Expression von Galektin-3 in PancTu1- und Panc1-Zellen. Analyse der Expression von Galektin-3 in benignen, prämaligen und malignen pankreatischen Gangepithel-Zelllinien mittels *Westernblot*. HSP90 wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Der abgebildete *Westernblot* aus drei unabhängigen Versuchen ist repräsentativ.

4.2 Der Einfluss von Galektin-3 auf das Migrationsverhalten von PDAC-Zellen

4.2.1 *Knockdown* von Galektin-3 reduziert die Migrationsfähigkeit von PDAC-Zellen nicht.

Zunächst erfolgte die Untersuchung der Migrationsfähigkeit in Abhängigkeit von Galektin-3 anhand von *Wound-healing-Assays*, bei denen die fotografischen Messungen mittels eines *NyOne*-Mikroskops automatisiert erfolgten. Hierzu wurde ein transients siRNA-vermittelter *Knockdown* von Galektin-3 mit einer Transfektionsdauer von 72 Stunden in PancTu1- und Panc1-Zellen durchgeführt (**Abb. 4.2**).



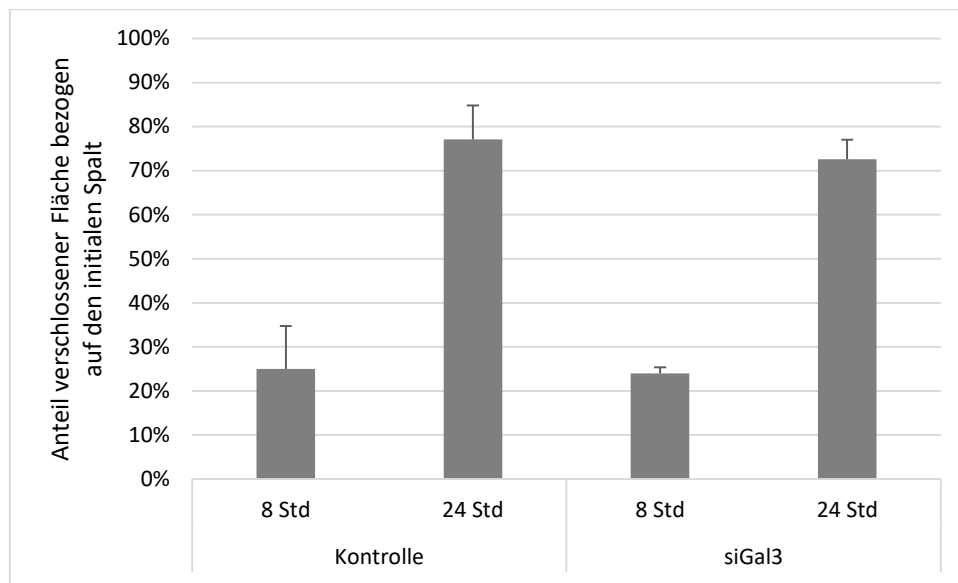
4.2 Transienter siRNA-vermittelter *Knockdown* von Galektin-3 führt zu verminderter Galektin-3-Expression in PDAC-Zellen. Detektion der Galektin-3-Expression mittels *Westernblot* von Ganzzelllysaten nach 72-stündiger Transfektion von PancTu1-Zellen und Panc1-Zellen mit Galektin-3-siRNA bzw. Kontroll-siRNA. HSP90 wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Der gezeigte *Westernblot* ist repräsentativ.

Bei den mit Kontroll-siRNA transfizierten PancTu1-Zellen waren nach acht Stunden 25 % des Spalts verschlossen und nach 24 Stunden 77,1 % (**Abb. 4.3A**). Bei den PancTu1-Zellen mit *Knockdown* von Galektin-3 betrug die verschlossene Fläche nach acht Stunden 24 % und nach 24 Stunden 72,6 % des initialen Spalts.

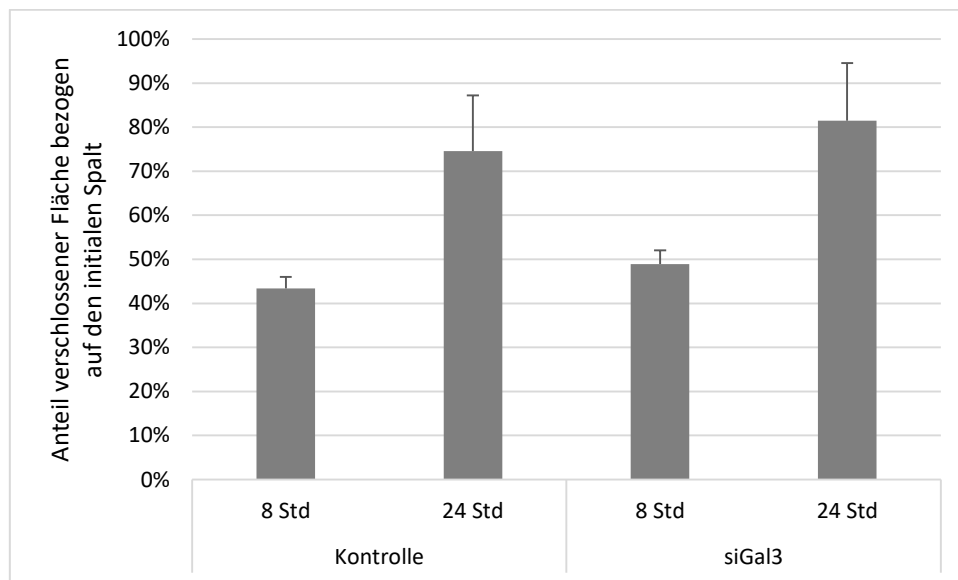
Bei den mit Kontroll-siRNA transfizierten Panc1-Zellen waren nach acht Stunden 43,4 % der anfangs freien Fläche verschlossen und 74,6 % nach 24 Stunden (**Abb. 4.3B**). Eine Behandlung mit Galektin-3-siRNA führte nach acht Stunden zu einer zu 48,9 % verschlossenen Fläche und einer zu 81,5 % verschlossenen Fläche nach 24 Stunden. Dies entspricht einer Zunahme der Migrationsintensität durch *Knockdown* von Galektin-3 im Vergleich zur Kontrolle um 5,5 % nach acht Stunden bzw. um 6,9 % nach 24 Stunden.

Da ein leichter Rückgang der Migration bei PancTu1-Zellen unter Galektin-3 *Knockdown* beobachtet wurde, wurde das Migrationsverhalten dieser Zelllinie nach 120 Std transientem siRNA-vermitteltem *Knockdown* von Galektin-3 mittels einer weiteren Analysemethode untersucht.

A)

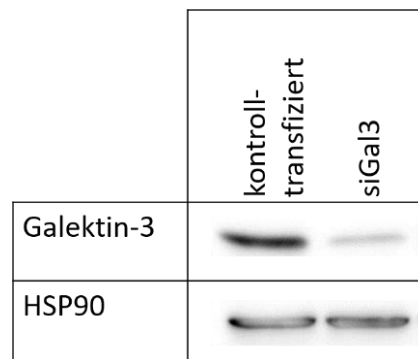


B)



4.3: Knockdown von Galektin-3 reduziert die Migrationsfähigkeit von PancTu1- und Panc1-Zellen nicht. Die Migrationsfähigkeit von **A)** PancTu1-Zellen und **B)** Panc1-Zellen wurde mittels eines *Wound-healing-Assays* nach *Knockdown* von Galektin-3 (siGal3) bzw. nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (Kontrolle) nach 72-stündiger Transfektionsdauer untersucht. Automatisierte fotografische Aufnahmen erfolgten mit einem *NyOne*-Mikroskop. Dargestellt wird die durch Zellmigration verschlossene Fläche im Verhältnis zum initialen Wundspalt für die mit Galektin-3-siRNA (siGal3) bzw. Kontroll-siRNA (Kontrolle) transfizierten PancTu1-Zellen (in %). Gezeigt werden die Werte für die Zeitpunkte 8 bzw. 24 Std nach Beginn des Assays als Mittelwert \pm Standardabweichung (SA) von drei unabhängigen Experimenten.

Die Analyse erfolgte mittels eines *Wound-healing-Assays* nach transientem *Knockdown* des Lektins mit einer Transfektionsdauer von 120 Stunden (**Abb. 4.4**). Wie in **Abb. 4.4** dargestellt, konnte die Galektin-3-Expression dadurch deutlich in den PancTu1-Zellen vermindert werden.



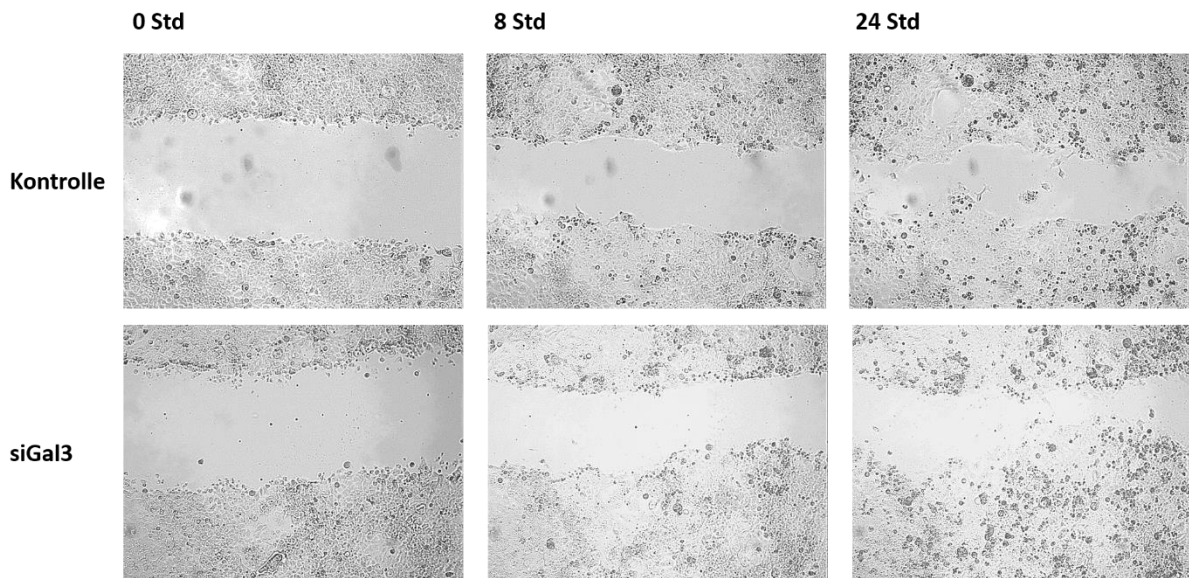
4.4: Verminderte Expression von Galektin-3 in PancTu1-Zellen nach transientem siRNA-vermitteltem *Knockdown* mit 120-stündiger Transfektionsdauer. Galektin-3-Expression in PancTu1-Zellen nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (kontroll-transfiziert) bzw. Galektin-3-spezifischer siRNA (siGal3). Als Ladekontrolle dient HSP90. Der abgebildete *Westernblot* mit Ganzzelllysaten ist repräsentativ.

Nach erfolgter Wundsetzung wurde die zellfreie Fläche in einer Frequenz von 1/10 Min mittels eines *JuLi Br Life-Cell-Imager* fotografisch festgehalten und mithilfe der *ImageJ-Software* bestimmt. In **Abb. 4.5A** ist die durch Migration verschlossene Fläche in Relation zu dem initialen Spalt, d.h. der zellfreien Fläche, dargestellt. Dies entspricht der Migrationsfähigkeit der Zellen.

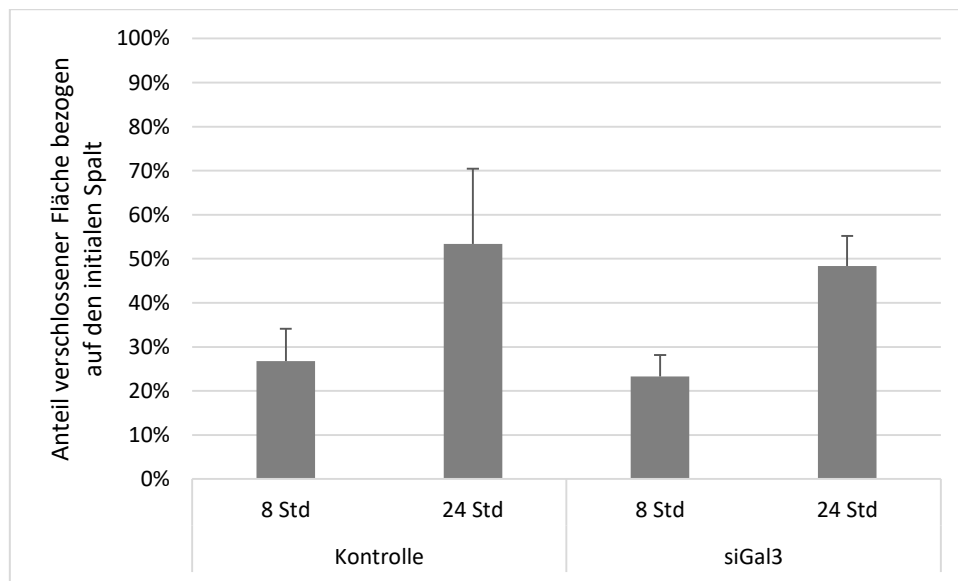
Acht Stunden nach Beginn des Assays waren in der Kontrolle 26,8 % des Spaltes verschlossen, nach 24 Stunden 53,4 % (**Abb. 4.5B**). Bei den mit Galektin-3 siRNA transfizierten Zellen war der Spalt nach acht Stunden zu 23,3 % und nach 24 Stunden zu 48,4 % verschlossen. Im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen zeigte sich eine Reduktion der Migrationsfähigkeit durch *Knockdown* von Galektin-3 um 13,1 % nach 8 Stunden und um 9,4 % nach 24 Stunden.

Demzufolge war durch Suppression von Galektin-3 kein signifikanter Effekt auf das Migrationsverhalten von PancTu1-Zellen zu beobachten.

A)



B)



4.5: Knockdown von Galektin-3 reduziert die Migrationsfähigkeit von PancTu1-Zellen nicht.

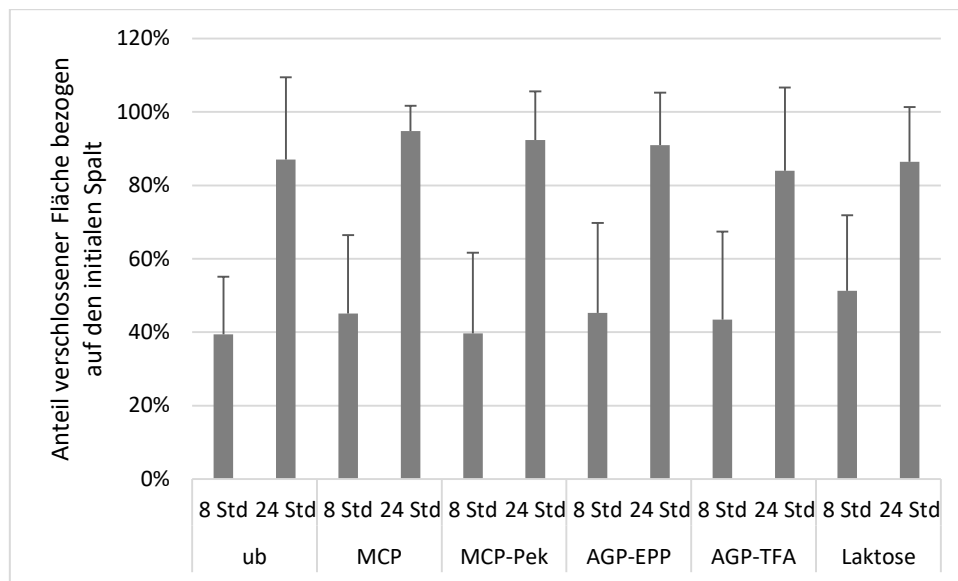
A) Die Migrationsfähigkeit von PancTu1-Zellen wurde mittels eines *Wound-healing-Assays* nach *Knockdown* von Galektin-3 (siGal3) bzw. Transfektion mit Kontroll-siRNA (Kontrolle) untersucht. Fotografische Aufnahmen erfolgten mit *Life-Cell-Imager JuLi Br* über 24 Std mit einer Frequenz von 1/10 Min. Repräsentative Aufnahmen eines *Migrationsassays* mit PancTu1-Zellen zu den Zeitpunkten 0, 8 und 24 Std. Gezeigt wird in der oberen Reihe der Kontroll-Ansatz, in der unteren Reihe der Ansatz mit Galektin-3-siRNA. Die Aufnahmen wurden bei einer 4-fachen Vergrößerung und maximalem digitalem Zoom der transfizierten Zellen gemacht. **B)** Dargestellt wird die durch Zellmigration verschlossene Fläche im Verhältnis zum initialen Wundspalt für die mit Galektin-3-siRNA (siGal3) bzw. Kontroll-siRNA transfizierten PancTu1-Zellen (Kontrolle) (in %). Werte zu den Zeitpunkten 8 bzw. 24 Std nach Beginn des Assays als Mittelwert \pm Standardabweichung (SA) von drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

4.2.2 Pflanzliche Polysaccharide vermindern die Migrationsfähigkeit von PancTu1- und Panc1-Zellen nicht.

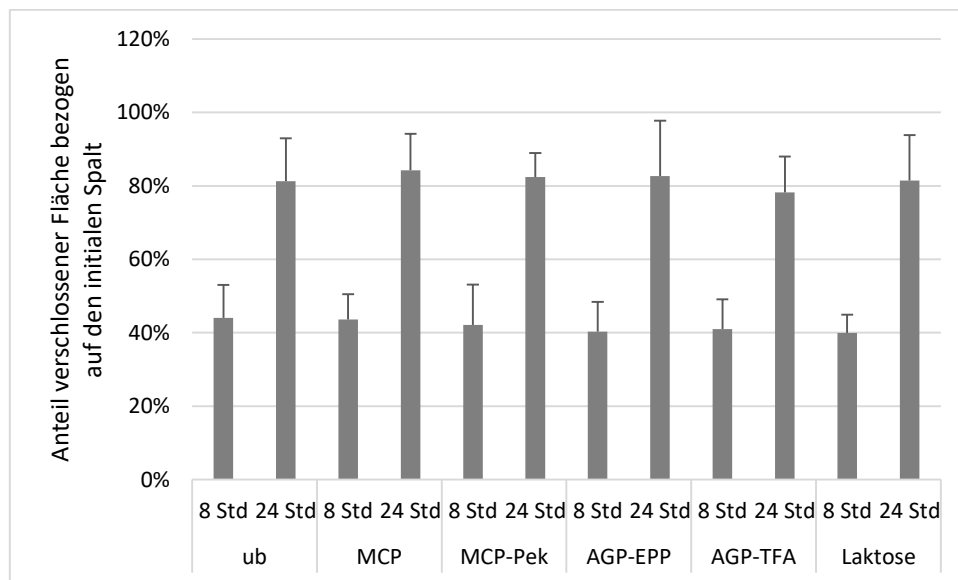
Um zu untersuchen, ob pflanzliche Polysaccharide an Galektin-3 binden und darüber das Migrationspotenzial der PDAC-Zellen beeinflussen, wurde ein *Wound-healing-Assay* mit PancTu1- und Panc1-Zellen durchgeführt. Dafür wurde ein *Wound-healing-Assay* unter Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden in der Konzentration von 1 µg/ml durchgeführt. Diese Konzentration hatte sich in vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe als wirksame Konzentration erwiesen und liegt in einem Konzentrationsbereich, der potenziell durch medikamentöse Applikation im Menschen erreichbar wäre. Es wurden folgende Polysaccharide zur Behandlung eingesetzt: modifiziertes Zitruspektin (MCP), mit Pektinase prozessiertes, modifiziertes Zitruspektin (MCP-Pek), Arabinogalaktan aus *Echinacea purpurea* (AGP-EPP) und mit Trifluoressigsäure prozessiertes Arabinogalaktan aus *Echinacea purpurea* (AGP-TFA). Ferner wurde als etablierter Galektin-3-Inhibitor Laktose in der Konzentration 342,29 µg/ml [10 mM] verwendet. Als Negativ-Kontrolle blieben die Zellen unbehandelt.

Es zeigte sich weder bei PancTu1- (**Abb. 4.6A**) noch bei Panc1-Zellen (**Abb. 4.6B**) ein Effekt durch die Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden auf das Migrationsverhalten der Zellen. Auch die Behandlung mit der Laktose-Lösung erwies sich als wirkungslos.

A)



B)

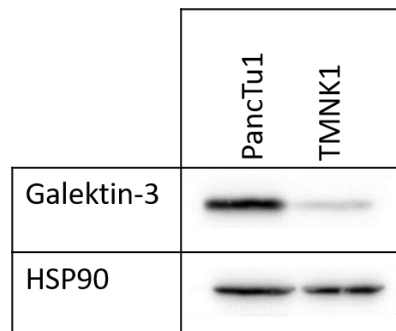


4.6: Pflanzliche Polysaccharide beeinflussen das Migrationsverhalten von PancTu1- und Panc1-Zellen nicht. Behandelt wurden **A)** PancTu1-Zellen und **B)** Panc1-Zellen während des *Wound-healing-Assays* mit dem jeweiligen Polysaccharid in der Konzentration 1 µg/ml bzw. mit Laktose-Lösung in der Konzentration 342,29 µg/ml und die Zellen blieben unbehandelt (ub). Die fotografischen Aufnahmen erfolgten zu Beginn, nach 8 sowie nach 24 Stunden mithilfe des *NyOne*-Mikroskops. Gezeigt wird der Anteil verschlossener Fläche (in %) bezogen auf die initial zellfreie Fläche zu den Zeitpunkten 8 bzw. 24 Stunden nach Beginn des Assays als Mittelwert ± Standardabweichung (SA) von drei unabhängigen Experimenten.

4.3 Die Bedeutung von Galektin-3 bei der Adhäsion von PDAC-Zellen an Leberendothelzellen

4.3.1 Basalexpression von Galektin-3 in der Leberendothelzelllinie TMNK-1

Vor der Untersuchung der Bedeutung von Galektin-3 bei der Adhäsion von PDAC-Zellen an Leberendothel wurde überprüft, ob die Leberendothelzelllinie TMNK-1 Galektin-3 exprimiert. Mittels *Western blot*-Analyse von Ganzzelllysaten konnte gezeigt werden, dass TMNK-1-Zellen im Gegensatz zu der PDAC-Zelllinie PancTu1 Galektin-3 kaum exprimieren (**Abb. 4.7**).

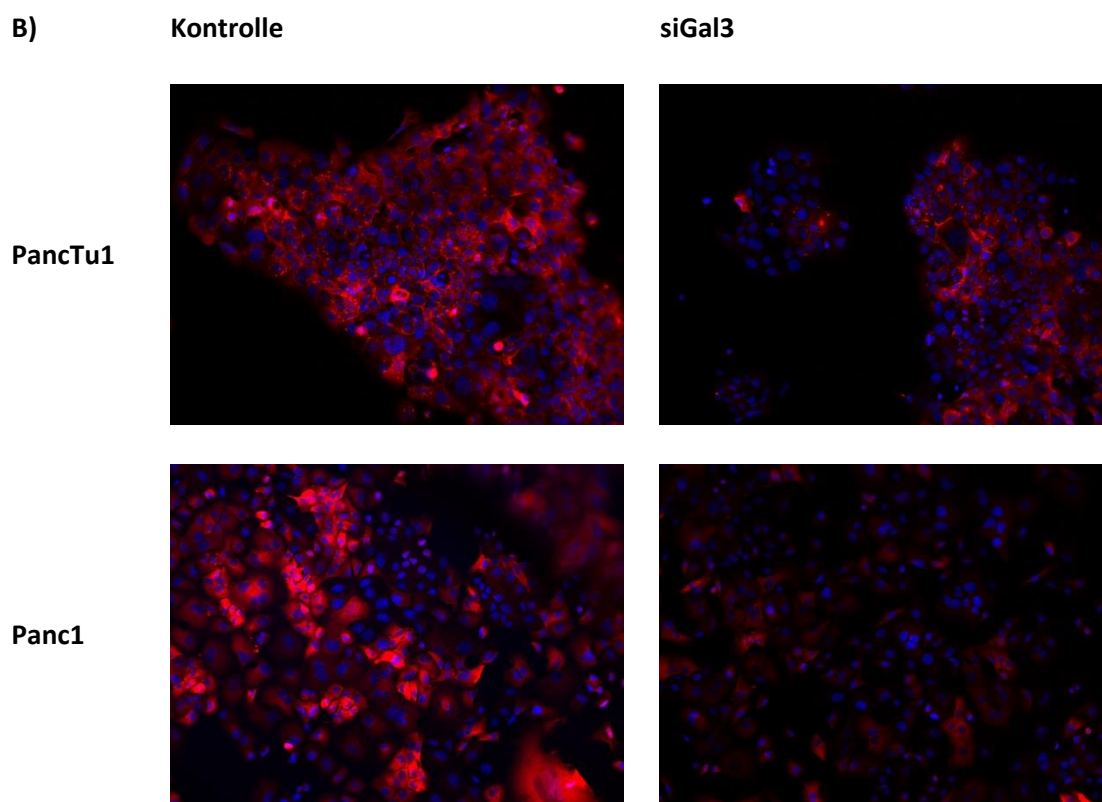
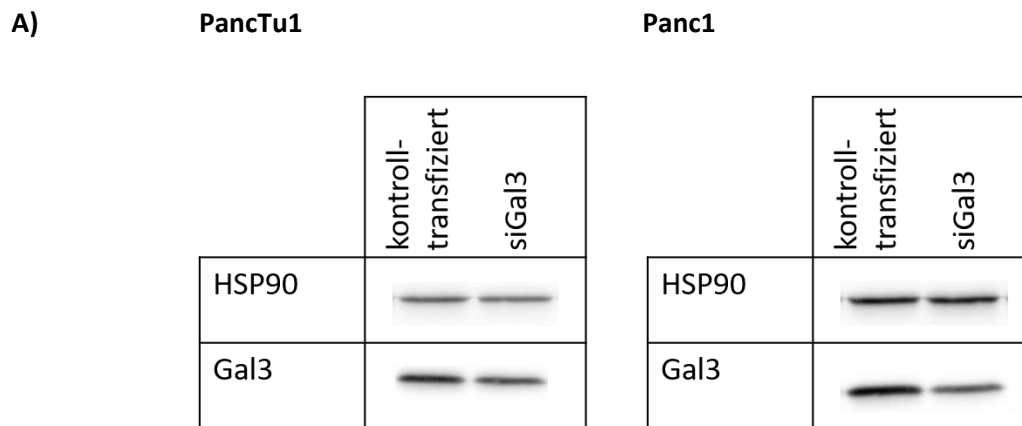


4.7: TMNK-1-Zellen exprimieren Galektin-3 im Gegensatz zu PancTu1-Zellen kaum. Charakterisierung der Galektin-3-Expression mittels *Western blot*. HSP90 wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Der gezeigte *Western blot* ist repräsentativ.

4.3.2 *Knockdown* von Galektin-3 führt zu einer verminderten Adhäsion von PDAC-Zellen an Leberendothelzellen.

Der Einfluss von Galektin-3 auf die Adhäsion von PDAC-Zellen wurde mithilfe eines *Adhäsionsassays* unter *Knockdown* von Galektin-3 untersucht. Die Transfektion mit Galektin-3-siRNA bzw. der Kontroll-siRNA erfolgte über eine Dauer von 72 Stunden bei PancTu1-Zellen und 120 Stunden bei Panc1-Zellen, bevor die Zellen im *Adhäsionsassay* eingesetzt wurden. Nach 90 Minuten Adhärenzzeit wurden die nicht adhärennten Zellen entfernt und die Fluoreszenz der an den TMNK-1-Zellen adhärennten Zellen im Fluorometer gemessen.

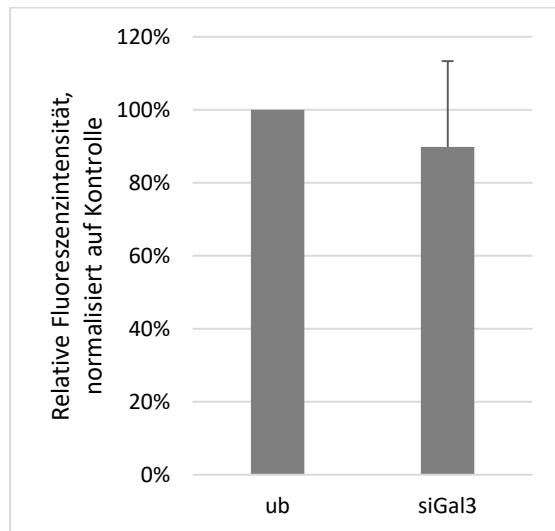
Der erfolgreiche *Knockdown* von Galektin-3 wurde zunächst mittels *Western blot* von Ganzzelllysaten (**Abb. 4.8A**) sowie Immunfluoreszenz-Färbung zur Detektion von membrangebundenem Galektin-3 nachgewiesen (**Abb. 4.8B**).



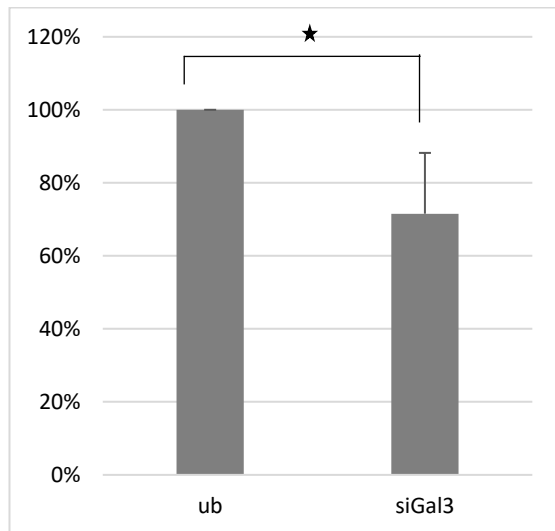
4.8: Transienter siRNA-vermittelter *Knockdown* von Galektin-3 führt zu verminderter Galektin-3-Expression in PDAC-Zellen. **A)** Detektion der Galektin-3-Expression mittels *Westernblot* von Ganzzelllysaten nach 72-stündiger Transfektion von PancTu1-Zellen und 120-stündiger Transfektion von Panc1-Zellen mit Galektin-3-siRNA bzw. Kontroll-siRNA. HSP90 wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Die abgebildeten *Westernblots* sind repräsentativ. **B)** Detektion der membranständigen Galektin-3-Expression mittels Immunfluoreszenz-Färbung nach 72-stündiger Transfektion von PancTu1- und Panc1-Zellen mit Kontroll- bzw. Galektin-3-siRNA mit nach dieser Transfektionszeit stabilstem und deutlichstem *Knockdown*. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mittels Hoechst (blau), Galektin-3 mittels spezifischer Antikörper (rot). Die fotografischen Aufnahmen erfolgten am *Keyence*-Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung und mit den Belichtungszeiten Hoechst (Zellkerne): 1/20 s, AF 647 (Gal3): 1 s. Die abgebildeten Färbungen sind repräsentativ.

Während bei PancTu1-Zellen die Adhäsion an die TMNK-1-Zellen durch *Knockdown* von Galektin-3 nur leicht beeinflusst und nur eine Reduktion um 10,2 % der Adhäsion im Vergleich zur Kontrolle beobachtet wurde (**Abb. 4.9A**), führte die Suppression von Galektin-3 in Panc1-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Adhärenz von 28,5 % (**Abb. 4.9B**).

A) PancTu1



B) Panc1



4.9: Knockdown von Galektin-3 vermindert die Adhäsion von PDAC- an Leberendothel-Zellen. Das Adhäsionsvermögen von PDAC-Zellen an Leberendothelzellen wurde mittels *Adhäsionsassay* untersucht. Es erfolgte eine 72-stündige Transfektion der **A)** PancTu1-Zellen und eine 120-stündige Transfektion der **B)** Panc1-Zellen mit Galektin-3-siRNA bzw. Kontroll-siRNA vor Beginn des Assays. Zudem wurden die PDAC-Zellen mit CFSE Fluoreszenz-markiert. Nach 90 Minuten Adhärenzzeit erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität mittels Tecan-Fluorometer. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität in %, **A)** normalisiert auf die Kontrolle bzw. **B)** auf die Proteinkonzentration und anschließend auf die Kontrolle, als Mittelwert \pm SA aus drei unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$. Statistische Analyse auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk, *Equal-Variance-Test*.

4.3.3 Kurzzeit-Inkubation mit pflanzlichen Polysacchariden bewirkt eine reduzierte Adhäsion von PDAC-Zellen an Leberendothelzellen.

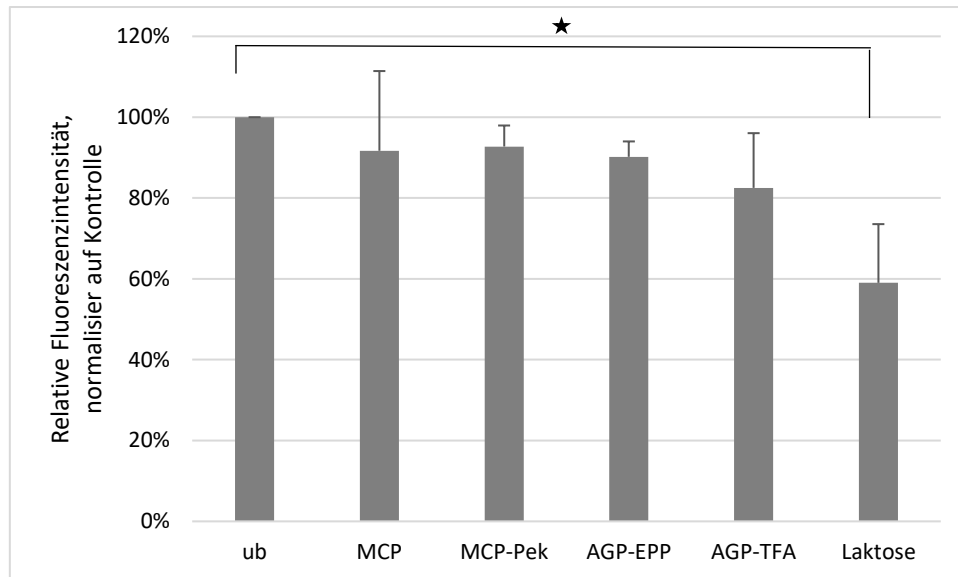
Anschließend wurde die Wirkung einer Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden (Konzentration: 1 $\mu\text{g/ml}$) auf die Adhäsion von PDAC-Zellen an Leberendothelzellen untersucht (**Abb. 4.10**). Die Polysaccharide wurden während der 90-minütigen Assay-Dauer zu den Zellen gegeben.

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen führte die Behandlung mit allen Polysacchariden nur zu einer geringen Verminderung der Adhäsion von PancTu1-Zellen an die TMNK1-Zellen (MCP: 8,3 %, MCP-Pek: 7,3 %, AGP-EPP: 9,8 %, AGP-TFA: 17,5 %). Der stärkste Effekt der Polysaccharide war durch AGP-TFA mit einer um 17,5 % reduzierten Adhäsion festzustellen. Die Behandlung mit Laktose als Positivkontrolle führte zur deutlichsten Reduktion um 41 % (**Abb. 4.10A**).

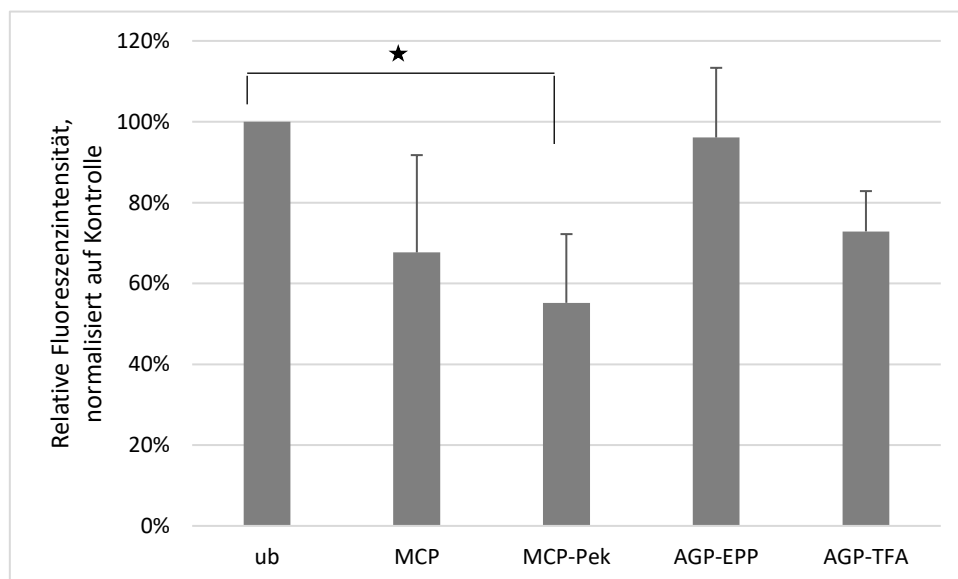
Bei Panc1-Zellen zeigte die Behandlung mit MCP-Pek den stärksten Effekt (**Abb. 4.10B**). Hier betrug die Reduktion der Adhäsion an TMNK-1-Zellen 45 % verglichen mit der Kontrolle. Die Behandlung mit MCP

fürte zu einer Reduktion des Adhäsionspotenzials der Panc1-Zellen um 32 %, mit AGP-EPP um 4 % und mit AGP-TFA um 27 %, jeweils bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

A)



B)



4.10: Einfluss der pflanzlichen Polysaccharide auf die Adhäsion von PDAC-Zellen an Leberendothelzellen. Das Adhäsionspotenzial von **A)** PancTu1-Zellen bzw. **B)** Panc1-Zellen an TMNK-1-Zellen wurde mittels *Adhäsionsassay* untersucht. Hierbei erfolgte die Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden in der Konzentration 1 µg/ml während der 90-minütigen *Assay*-Dauer. Laktose wurde in der Konzentration 342,29 µg/ml als Positivkontrolle eingesetzt. Als Kontrolle wurden die PDAC-Zellen unbehandelt (ub) belassen. Die Fluoreszenzintensität wurde mithilfe des Tecan-Fluorometers gemessen. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität (in %), normalisiert auf die Kontrolle, als Mittelwert ± SA aus drei unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$. Statistische Analyse mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung, *Equal-Variance*-Test und *Tukey*-Test.

Die deutlichste Reduktion der Adhäsion von PancTu1-Zellen an TMNK1-Zellen konnte zusammenfassend durch Einsatz von AGP-TFA erzielt werden, während sich bei Panc1-Zellen MCP-Pek als wirksamste Substanz erwies.

4.3.4 Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden nach *Knockdown* von Galektin-3 führt kaum zu einer zusätzlichen adhäsionsmindernden Wirkung.

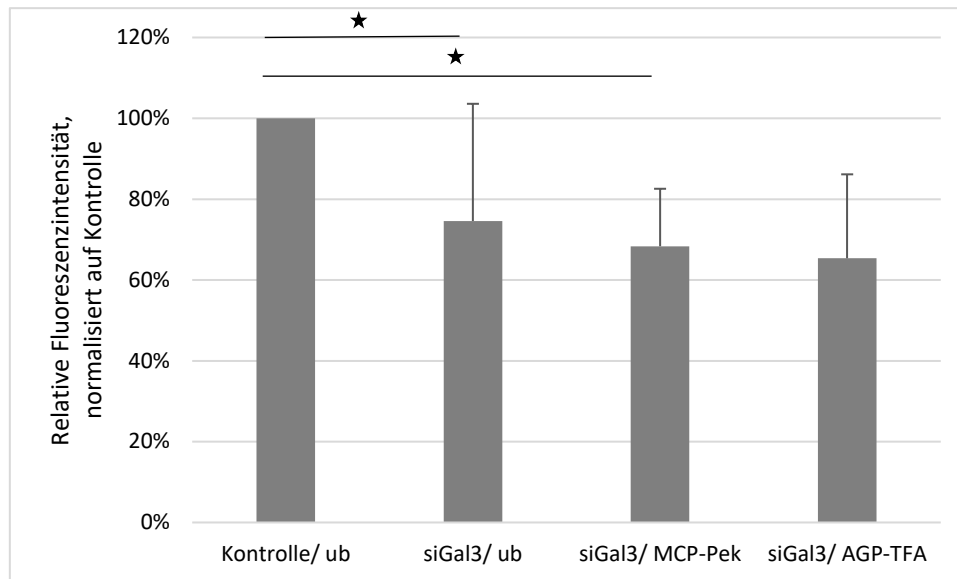
Nachdem sich durch einen *Knockdown* von Galektin-3 bzw. die Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden, insbesondere mit MCP-Pek und AGP-TFA, eine adhäsionsmindernde Wirkung von Panc1-Zellen an Leberendothelzellen gezeigt hatte, sollte anschließend untersucht werden, ob die Wirkung der pflanzlichen Polysaccharide Galektin-3-abhängig ist.

Dafür erfolgte eine 72-stündige Transfektion mit Galektin-3-siRNA bzw. Kontroll-siRNA. Die Behandlung mit den pflanzlichen Polysacchariden MCP-Pek bzw. AGP-TFA in den Konzentrationen 1 µg/ml erfolgte wiederum für die Dauer des *Adhäsionsassays*.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontrolle/ ub), für die die Zellen mit Kontroll-siRNA transfiziert und während des *Assays* mit Kulturmedium ohne Zusatz von pflanzlichen Polysacchariden behandelt wurden, führte die Transfektion mit Galektin-3-siRNA (siGal3/ ub), wie zuvor in Kapitel 4.3.2 gezeigt, zu einer Reduktion der Adhäsion an TMNK-1-Zellen um 25,4 % (**Abb. 4.11**).

Die Behandlung mit MCP-Pek nach transientem *Knockdown* von Galektin-3 (siGal3/ MCP-Pek) verminderte im Vergleich zu transientem *Knockdown* von Galektin-3 und Behandlung mit Kulturmedium ohne Polysaccharid-Zusatz (siGal3/ ub) die Adhäsion an TMNK-1-Zellen um weitere 6,24 %. Der Effekt einer Behandlung mit AGP-TFA nach transientem *Knockdown* von Galektin-3 (siGal3/ AGP-TFA) war mit einer Adhäsions-Reduktion um 9,23 %, verglichen mit einem transienten *Knockdown* von Galektin-3 ohne Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden (siGal3/ ub), ebenfalls gering (**Abb. 4.11**).

Zusammenfassend wurde der adhäsionsmindernde Effekt durch transienten *Knockdown* von Galektin-3 in Panc1-Zellen durch anschließende Behandlung mit den pflanzlichen Polysacchariden MCP-Pek bzw. AGP-TFA kaum zusätzlich verstärkt.



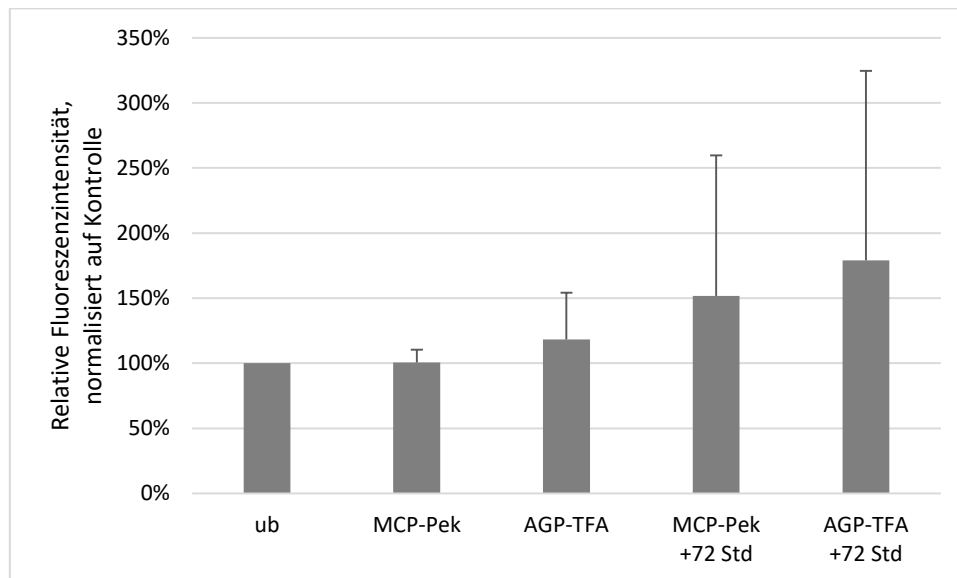
4.11: Die Behandlung mit den pflanzlichen Polysacchariden MCP-Pek bzw. AGP-TFA nach *Knockdown* von Galektin-3 führt, im Vergleich zu ausschließlichem *Knockdown* von Galektin-3, kaum zu einer zusätzlichen Reduktion der Adhäsion von Panc1-Zellen an Leberendothelzellen. Das Adhäsionspotenzial von Panc1-Zellen an TMNK-1-Zellen wurde mittels *Adhäsionsassay* untersucht. Hierbei erfolgte zunächst eine 72-stündige Transfektion mit Galektin-3-siRNA bzw. Kontroll-siRNA der Panc1-Zellen. Anschließend wurden die Zellen mit den pflanzlichen Polysacchariden MCP-Pek (siGal3/ MCP-Pek) bzw. AGP-TFA (siGal3/ AGP-TFA) in der Konzentration von 1 µg/ml während der 90-minütigen Assay-Dauer behandelt. Als Kontrollen blieben Kontroll-transfizierte (Kontrolle/ ub) bzw. mit Galektin-3-siRNA transfizierte Panc1-Zellen (siGal3/ ub) unbehandelt. Die Fluoreszenzintensität wurde mithilfe des Tecan-Fluorometers gemessen. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität (in %), normalisiert auf die Zellzahl und anschließend auf siGal3-transfizierte, unbehandelte Zellen, als Mittelwert ± SA aus vier unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung, *Equal-Variance*-Test und Student-Newmans-Keuls-Methode.

4.3.5 Langzeit-Inkubation mit pflanzlichen Polysacchariden fördert die Adhäsion von PancTu1-Zellen an Leberendothelzellen.

Durch die 90-minütige Behandlung mit den pflanzlichen Polysacchariden zeigte sich in 4.3.3 eine deutliche Reduktion des Adhäsionspotenzials der Panc1-Zellen an TMNK-1-Zellen, jedoch nur eine geringe Reduktion des Adhäsionspotenzials der PancTu1-Zellen. Daran anknüpfend sollte nun untersucht werden, ob eine Vorstimulation mit den pflanzlichen Polysacchariden die Adhäsion der PancTu1-Zellen stärker reduzieren kann (**Abb. 4.12**).

Dazu wurden die PancTu1-Zellen zusätzlich über einen Zeitraum von 72 Stunden mit den pflanzlichen Polysacchariden in der Konzentration von 1 µg/ml inkubiert und anschließend ihr Adhäsionsverhalten im *Adhäsionsassay* analysiert. Im Assay wurde das Adhäsionsvermögen von Langzeit-vorstimulierten Zellen (MCP-Pek + 72 Std bzw. AGP-TFA + 72 Std) mit Zellen verglichen, die der Behandlung wie zuvor in 4.3.3 beschrieben, nur während der Assay-Dauer von 90 Minuten ausgesetzt waren (MCP-Pek, AGP-TFA).

Im Gegensatz zu den nur im Assay behandelten PancTu1-Zellen (MCP-Pek bzw. AGP-TFA), zeigte sich bei den zusätzlich vorbehandelten Zellen (MCP-Pek + 72 Std und AGP-TFA + 72 Std) sogar eine Zunahme der Adhäsion an Leberendothelzellen um 51,8 % nach Behandlung mit MCP-Pek und um 79,1 % nach Behandlung mit AGP-TFA, jeweils bezogen auf die unbehandelten Zellen.



4.12: Verlängerung der Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden verstärkt Adhäsion von PancTu1-Zellen an TMNK-1-Zellen. PancTu1-Zellen wurden entweder mit 1 µg/ml MCP-Pek und AGP-TFA nur während des *Adhäsionsassays* (MCP-Pek bzw. AGP-TFA) oder zusätzlich noch für 72 Std mit den Substanzen vorbehandelt (MCP-Pek + 72 Std bzw. AGP-TFA + 72 Std). Als Kontrolle blieben die Zellen unbehandelt (ub). Die Fluoreszenzintensität wurde mittels des Tecan-Fluorometers gemessen. Es erfolgte eine Normalisierung auf die Proteinkonzentration und anschließend auf die Kontrolle. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität (in %) als Mittelwert \pm SA aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung und *Equal-Variance*-Test.

4.3.6 Effekte der Langzeit-Inkubation mit pflanzlichen Polysacchariden auf die Galektin-3 vermittelte Signaltransduktion.

Da sich durch längere Behandlung der PDAC-Zellen eine Förderung der Adhäsion an Leberendothelzellen ergab, wurde als nächstes untersucht, welche Auswirkungen die Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden auf die Galektin-3-vermittelte Signaltransduktion hat. Dafür wurden PancTu1-Zellen und Panc1-Zellen für eine Dauer von 72 Stunden mit den genannten Substanzen stimuliert bzw. als unbehandelte Kontrolle mit Kulturmedium ohne Substanzen kultiviert. Im Anschluss wurde die Proteinexpression verschiedener Signalwegmediatoren, für die eine Galektin-3-Abhängigkeit beschrieben ist, mittels *Westernblot* analysiert (**Abb. 4.13A-E**). Durch *kras*-Mutationen, die zu knapp 95 % im PDAC zu finden sind, werden die Signalwege Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) und *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) aktiviert. Über MAPK wiederum werden die nachgeschalteten Kinasen ERK1/2, cJun und SAPK/p38-MAPK aktiviert. In der Folge kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation von Zellproliferation, -überleben, -metabolismus, -differenzierung und Apoptose beteiligt sind [57]. Neben Mutationen kann eine Aktivierung von *kras* auch über Galektin-3 vermittelt

werden. Diese führt in humanen Mammakarzinom-Zelllinien zu einer nachfolgenden Aktivierung von ERK und einer Inaktivierung des PI3K/AKT-Signalweges [58]. Für das Ösophaguskarzinom ist eine Galektin-3-vermittelte Aktivierung des AKT- und ERK-Signalweges beschrieben [59]. Beim PDAC kann eine positive Regulation des EGFR/ERK/Runx1-Signalweges über Galektin-3 vermittelt werden [12].

Durch 72-stündige Stimulation mit den pflanzlichen Polysacchariden AGP-EPP und AGP-TFA kam es, verglichen mit der Kontrolle, zu einer verminderten Galektin-3-Expression in PancTu1-Zellen. Die Behandlung von PancTu1-Zellen mit MCP und MCP-Pek führte hingegen zu keiner Veränderung in der Galektin-3-Expression. In Panc1-Zellen war die Galektin-3-Expression durch die unterschiedlichen Polysaccharide nicht beeinflusst (**Abb. 4.13A**).

Des Weiteren wurden mögliche Veränderungen in der Proteinexpression von MAPK-Signalmediatoren untersucht (**Abb. 4.13B**). Nach Behandlung von PancTu1-Zellen mit MCP und MCP-Pek zeigte sich die Gesamtexpression von ERK leicht verstärkt, nach Behandlung mit AGP-EPP und AGP-TFA deutlich verstärkt. Die phosphorylierte (aktivierte) Form (p-ERK) war in PancTu1-Zellen nach Behandlung mit MCP, MCP-Pek und AGP-EPP verstärkt exprimiert. In Panc1-Zellen wurde keine Veränderung der ERK- und p-ERK-Expression nach Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden festgestellt. Die Expression von cJun war in beiden Zelllinien nicht reguliert (**Abb. 4.13B**).

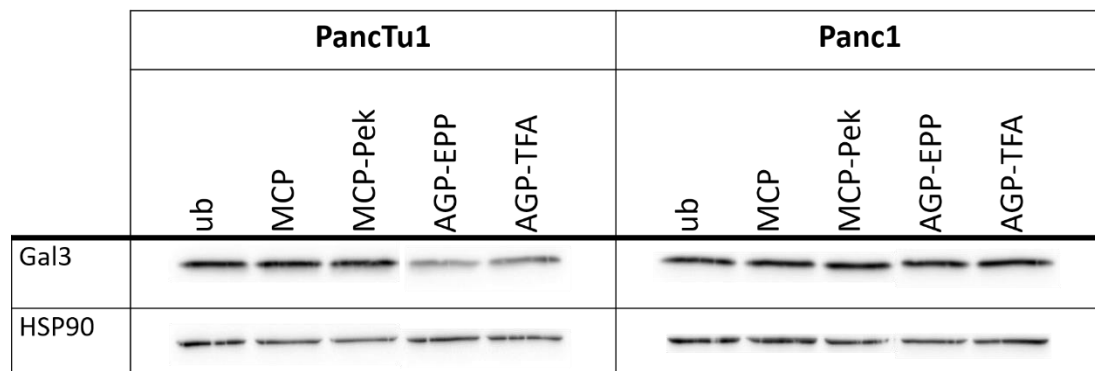
Die Gesamtexpression von AKT zeigte sich in beiden Zelllinien als nicht reguliert, jedoch war die Expression der phosphorylierten (aktivierten) Form (pAKT) in PancTu1-Zellen nach Behandlung mit MCP und MCP-Pek leicht und nach Behandlung mit AGP-EPP und AGP-TFA deutlich reduziert. In Panc1-Zellen führte die Behandlung mit MCP und MCP-Pek zu keiner veränderten pAKT-Expression. Dagegen zeigte sich bei Panc1-Zellen eine verstärkte pAKT-Expression nach Behandlung mit AGP-EPP und AGP-TFA (**Abb. 4.13C**). Für PDAC-Zelllinien konnte bereits gezeigt werden, dass die Galektin-3-Expression positiv mit der Expression der phosphorylierten Form der *Glycogen Synthase Kinase 3 β* (p-GSK3 β) korreliert ist [60]. Eine verminderte Expression von p-GSK3 β ist mit einer reduzierten Fähigkeit zur Migration und Invasion assoziiert [60]. Nach Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden war die Expression von GSK3 β sowie p-GSK3 β weder in PancTu1- noch in Panc1-Zellen verändert (**Abb. 4.13C**).

Im Hinblick auf *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1b* (Rac1b), das die TGF- β 1-induzierte Zellmigration bei PDAC-Zellen hemmt [61] und den Gegenspieler von Rac1 darstellt [61, 62], zeigte sich keine Regulation der Proteinexpression in PancTu1-Zellen. In Panc1-Zellen kam es hingegen zu einer leichten Suppression der Rac1b-Expression nach Behandlung mit MCP-Pek sowie zu einer deutlichen Suppression der Rac1b-Expression nach Behandlung mit AGP-EPP und AGP-TFA (**Abb. 4.13D**).

Weiterhin wurde die mögliche Beeinflussung der Expression von FOXO1 und FOXO3 untersucht. FOXO-Proteine stellen Transkriptionsfaktoren des *Insulin-like-growth-factor*-Signalwegs dar [63] und unterliegen wiederum einer Regulation durch den PI3K/AKT-Signalweg [63, 64]. Sie sind u.a. an der Regulation von Zellmetabolismus, oxidativem Stress und Apoptose beteiligt, indem sie beispielsweise die Expression der für Entgiftung zuständigen Schlüsselenzyme *Manganese superoxide dismutase* (*MnSOD*), Katalase und *Growth Arrest And DNA Damage* (*GADD45*) regulieren [63]. Die Rolle der FOXO-Transkriptionsfaktoren in der Metastasierung ist nicht endgültig geklärt. Untersuchungen an PDAC-Zelllinien zeigten jedoch, dass ein *Knockdown* von FOXO3 zu einer Verminderung des Tumorwachstums und der Ausbildung von Metastasen führt. [65]. Für eine Regulation der Expression von FOXO1 und FOXO3 nach Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden ergab sich nach *Westernblot*-Analyse kein Anhalt, da sie weder in PancTu1- noch in Panc1-Zellen verändert war (**Abb. 4.13E**).

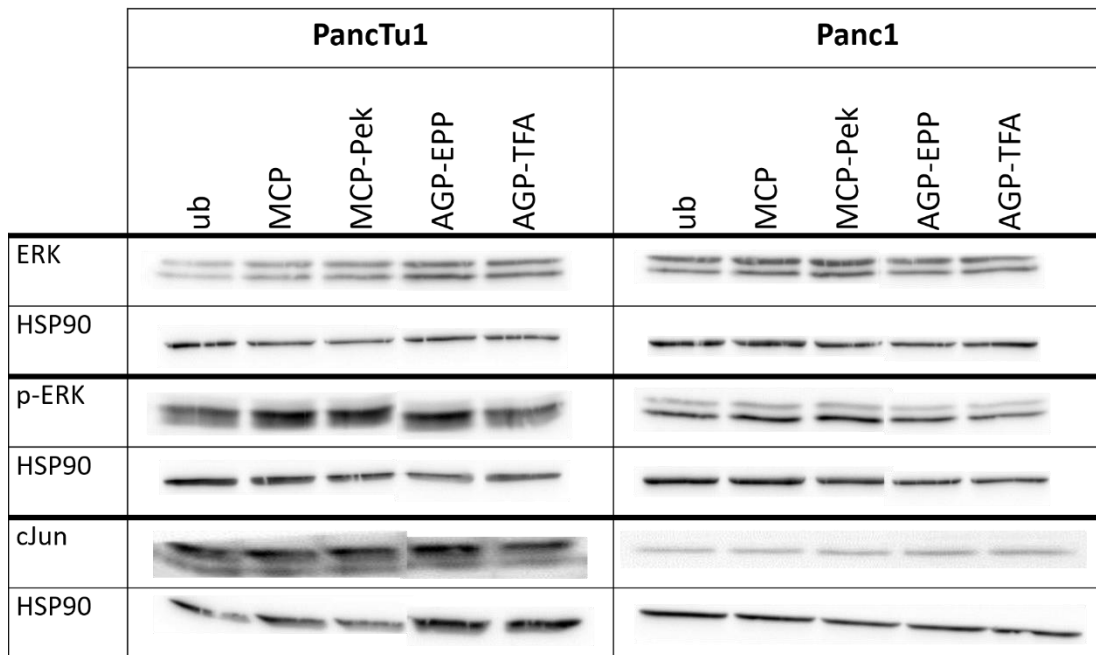
Zusammenfassend zeigte sich bei PancTu1-Zellen insbesondere nach Behandlung mit AGP-EPP und AGP-TFA eine Verminderung der Galektin-3- und pAKT-Expression, ERK und p-ERK waren vermehrt exprimiert, Rac1b blieb unverändert exprimiert. Bei Panc1-Zellen war die Expression von Galektin-3, ERK und p-ERK nach Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden unverändert. pAKT wurde dagegen verstärkt exprimiert, Rac1b supprimiert.

A)

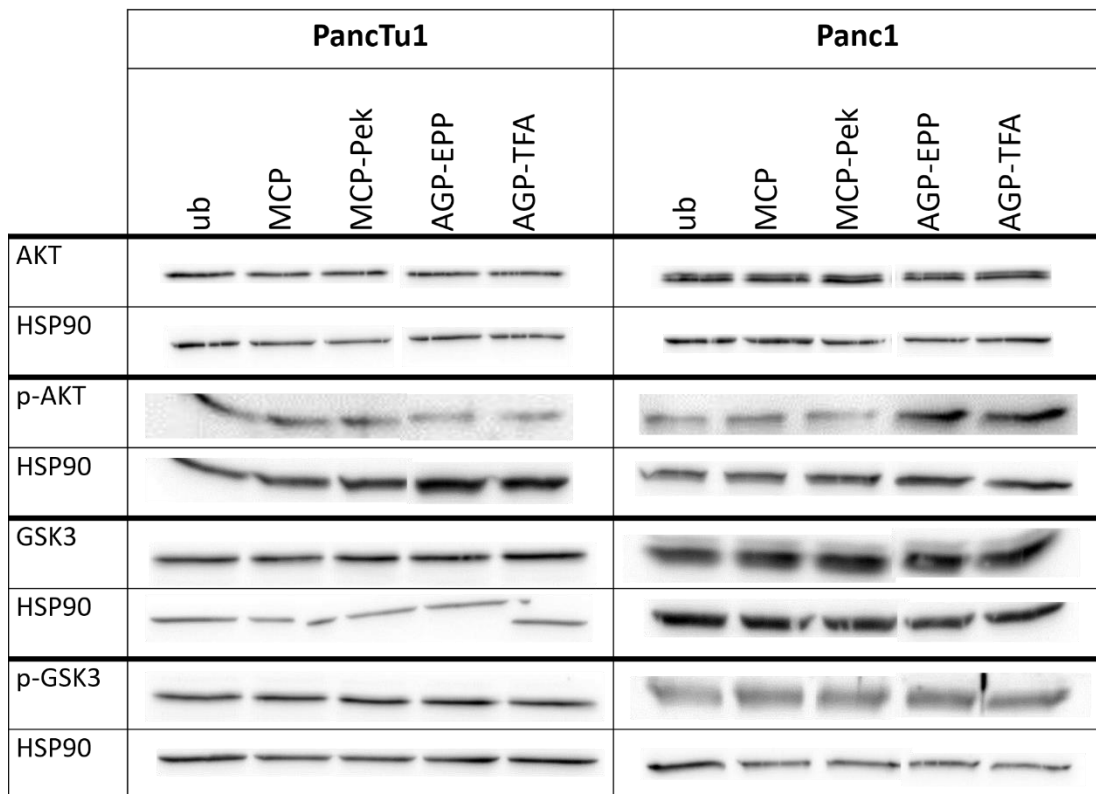


4.13: Einfluss der Behandlung mit den pflanzlichen Polysacchariden MCP, MCP-Pek, AGP-EPP und AGP-TFA auf die Proteinexpression von Galektin-3 in PancTu1- und Panc1-Zellen. *Westernblot*-Analyse von Ganzzelllysaten nach 72-stündiger Behandlung von PancTu1- und Panc1-Zellen mit pflanzlichen Polysacchariden in der Konzentration 1 µg/ml bzw. Kulturmedium ohne Substanz-Zusatz als unbehandelte Kontrolle (ub). Analysiert wurden die Proteinniveaus von **A)** Galektin-3 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (ub). Als Ladekontrolle diente HSP90. Gezeigt werden repräsentative *Westernblots*.

B)

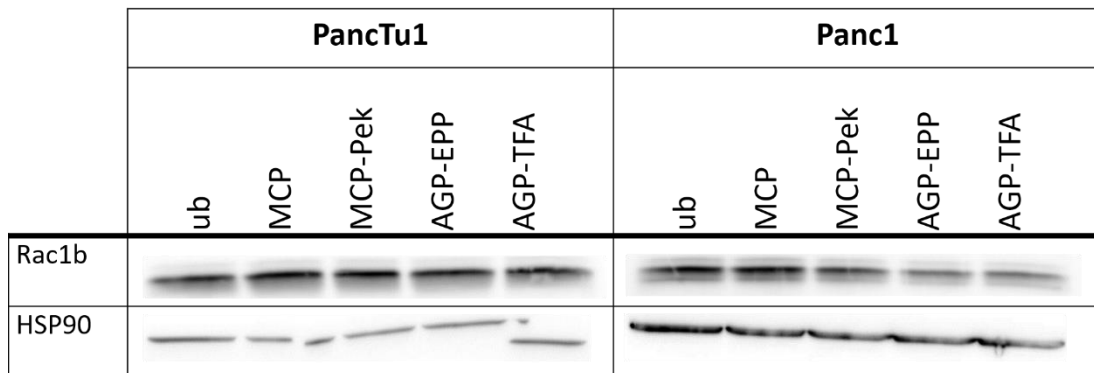


C)

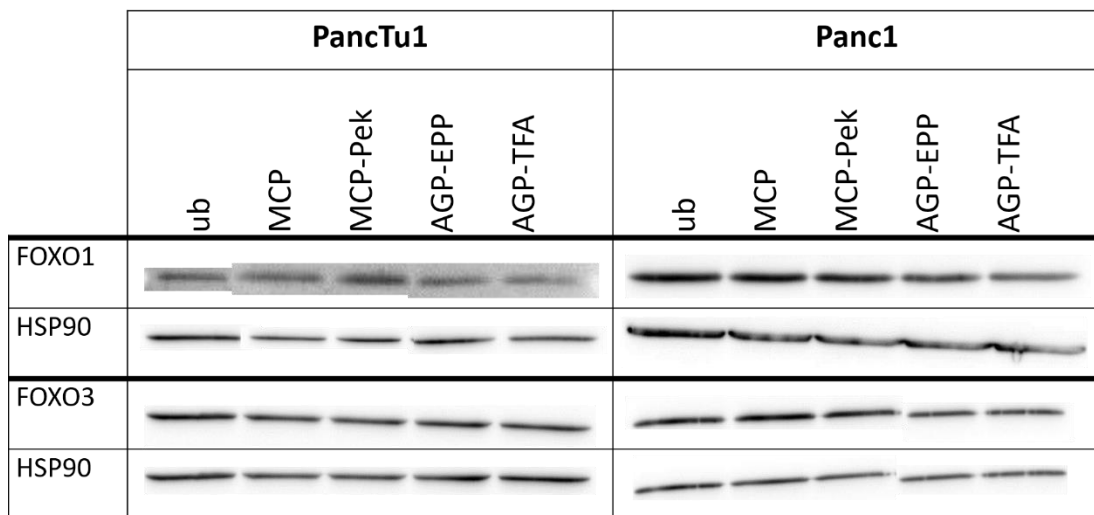


4.13: Einfluss der Behandlung mit den pflanzlichen Polysacchariden MCP, MCP-Pek, AGP-EPP und AGP-TFA auf die Proteinexpression mit Galektin-3 in Beziehung stehenden Signalmediatoren in PancTu1- und Panc1-Zellen. *Westernblot*-Analyse von Ganzzelllysaten nach 72-stündiger Behandlung von PancTu1- und Panc1-Zellen mit pflanzlichen Polysacchariden in der Konzentration 1 µg/ml bzw. Kulturmedium ohne Substanz-Zusatz als unbehandelte Kontrolle (ub). Analysiert wurden die Proteinniveaus von **B)** ERK, pERK, cJun, **C)** AKT, p-AKT, GSK3 und p-GSK3 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (ub). Als Ladekontrolle diente HSP90. Gezeigt werden repräsentative *Westernblots*.

D)



E)



4.13: Einfluss der Behandlung mit den pflanzlichen Polysacchariden MCP, MCP-Pek, AGP-EPP und AGP-TFA auf die Proteinexpression mit Galektin-3 in Beziehung stehenden Signalmediatoren in PancTu1- und Panc1-Zellen. *Western blot*-Analyse von Ganzzelllysaten nach 72-stündiger Behandlung von PancTu1- und Panc1-Zellen mit pflanzlichen Polysacchariden in der Konzentration 1 µg/ml bzw. Kulturmedium ohne Substanz-Zusatz als unbehandelte Kontrolle (ub). Analysiert wurden die Proteinniveaus von **D)** Rac1b sowie **E)** FOXO1 und FOXO3 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (ub). Als Ladekontrolle diente HSP90. Gezeigt werden repräsentative *Westernblots*.

5 Diskussion

Das PDAC stellt trotz jahrzehntelanger Forschung noch immer eine fatale Tumorerkrankung dar, bei deren Erstdiagnose die Betroffenen in 80 % der Fälle eine lokal oder systemisch fortgeschrittene Erkrankung aufweisen [1, 5]. Für die Behandlung und Prävention von (Mikro-)Metastasen existiert bislang keine effektive zielgerichtete Therapie [1]. Darum ist es dringend notwendig, zu einem fundierten und detaillierteren Verständnis der Pathogenese des PDAC zu gelangen. Aufgrund seiner Bedeutung in Prozessen wie Zelladhäsion und -migration könnte hierbei Galektin-3 eine mögliche therapeutisch nutzbare Zielstruktur darstellen, weshalb dessen Rolle in der Pathogenese des PDAC, insbesondere für die metastasierungs-assoziierten Prozesse der Migration und der Adhäsion an Leberendothelzellen in der vorliegenden Arbeit aufgeklärt werden sollte. Zudem sollte die potenziell hemmende Wirkung pflanzlicher Polysaccharide (Modifiziertes Zitruspektin und Arabinogalaktan aus *Echinacea purpurea* sowie prozessierte Formen dieser Substanzen, siehe Kapitel 2.5) auf diese Prozesse getestet werden.

5.1 Die Bedeutung von Galektin-3 für die Migration von PDAC-Zellen

Zunächst wurde anhand eines *Wound-healing-Assays* unter *Knockdown* von Galektin-3 untersucht, ob Galektin-3 an der Migration von PDAC-Zellen beteiligt ist (siehe Kapitel 4.2.1). Hierbei zeigte sich keine Beeinflussung des Migrationspotenzials der PDAC-Zelllinien PancTu1 und Panc1 durch transienten siRNA-vermittelten *Knockdown* von Galektin-3. Weiterhin wurde das Migrationspotenzial der beiden PDAC-Zelllinien im *Wound-healing-Assay* durch Behandlung mit den pflanzlichen Polysacchariden in der Konzentration 1 µg/ml während des Assays (siehe Kapitel 4.2.2) nicht beeinflusst.

Diese Befunde indizieren, dass Galektin-3 für die Migration von PDAC-Zellen entweder nicht von Bedeutung ist oder, dass andere Moleküle (wie beispielsweise Galektin-1 oder Galektin-9) reaktiv auf den transienten *Knockdown* von Galektin-3 verstärkt exprimiert werden und die migrationsfördernde Wirkung von Galektin-3 übernehmen. Laut Liu und Rabinovich [21] erfüllt Galektin-1, genauso wie Galektin-3, pro-migratorische und Invasions-fördernde Funktionen, wobei es ebenfalls mit Integrinen und weiteren Zelloberflächen-Proteinen interagiert. Eine im Vergleich zu physiologischem Pankreasgangepithel erhöhte Expression von Galektin-1 in PDAC-Gewebe [66, 67] bzw. im Tumorstroma [22] konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden und ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert [22]. Thijssen et al. [22] konnten zeigen, dass die Expression von Galektin-4 und -9 im PDAC im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe erhöht ist, während Galektin-2 unverändert und Galektin-8 vermindert exprimiert wird. Das Zusammenwirken der diversen Galektine ist bislang nicht ausreichend untersucht [21]. Aktuelle Analysen durch Miller et al. [68] weisen auf mögliche direkte Interaktionen zwischen verschiedenen Galektin-Subtypen ebenso wie auf einen Austausch von Domänen zwischen

diesen hin. Weitere *Wound-healing-Assays* unter *Knockdown* mehrerer Galektin-Subtypen könnten daher Aufschluss über das Zusammenwirken dieser Moleküle geben.

In vitro-Analysen an murinen Mammakarzinom-Zellen ergaben, dass Galektin-3 über Bindung an N-Cadherin und GM1-Gangliosid an der Destabilisierung von Zell-Zell-Interaktionen bei dieser Tumorentität beteiligt ist [69]. Ebenso zeigte sich eine Zunahme der Migration der humanen Mammakarzinom-Zelllinie 341 durch Zugabe von Galektin-3 (maximaler Effekt bei einer Galektin-3-Konzentration nahe 10 µg/ml) [70]. Kobayashi et al. [60] beobachteten bei den humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien Panc1, AsPC-1 und BxPC-3 eine verminderte Migration nach transientem *Knockdown* von Galektin-3 mit 48-stündiger Transfektionszeit im *Boyden-Kammer-Assay*. Entsprechende Ergebnisse erzielten sie für Panc1-Zellen mithilfe von *Wound-healing-Assays*, die jedoch nicht quantitativ ausgewertet, sondern ausschließlich anhand von beispielhaften mikroskopischen Aufnahmen präsentiert wurden. Die Auswertung der Migrationsfähigkeit der Zellen erfolgte anhand der Anzahl migrierender Zellen im Verhältnis zur zellfreien Fläche. Mögliche Erklärungen für die divergierenden Befunde dieser Studien und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten hierbei Schwankungen in der Spaltbreite und der Zelldichte sein. Kobayashi et al. verwendeten zudem während der *Assays* 10 %-FCS-haltiges Kulturmedium [60], wohingegen in der vorliegenden Arbeit mit 1 %-FCS-haltigem Medium gearbeitet wurde. Daher ist fraglich, ob tatsächlich nur das Migrationsverhalten der Zellen und nicht auch die Proliferationsfähigkeit zur Spaltschließung beitrug. Immerhin stellten Kobayashi et al. jedoch mittels eines *MTT-Assay* fest, dass eine 72-stündige Transfektion mit Galektin-3-siRNA im Vergleich mit Kontroll-siRNA keinen Effekt auf die Proliferation der Zelllinien Panc1, AsPC-1 und BxPc-3 hat. Zudem zeigte sich in *Invasion-assays* ein vermindertes Invasionsverhalten aller drei Zelllinien nach *Knockdown* von Galektin-3, wobei die Zelllinie AsPC-1 generell wenig Zellinvasion zeigte und diese geringen Zellzahlen miteinander verglichen wurden, was statistisch große Unterschiede impliziert: So wurden im Mittel 3 invadierte Zellen pro Feld des mit Kontroll-siRNA transfizierten Ansatzes mit einer invadierten Zelle pro Feld des mit Gal3-siRNA transfizierten Ansatzes verglichen [60]. Die genannten methodischen Schwächen und unterschiedlichen methodischen Ansätze könnten die Differenz zu den von uns erzielten Ergebnissen im Hinblick auf die Zelllinie Panc1 erklären. Abgesehen davon könnten die Unterschiede auch auf Veränderungen der Zelllinie aufgrund hoher Passagenzahl bzw. langer Kultivierung seit der Etablierung zurückzuführen sein.

Eine pro-migratorische Wirkung von zirkulierendem Galektin-3 stellten darüber hinaus Gao et al. [71] bei der humanen Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa fest. Sie zeigten, dass die Migration dieser Zellen unabhängig von der endogenen Galektin-3-Expression von exogenem, zirkulierendem Galektin-3 über die Aktivierung von ERK1/2 initiiert wird [71].

Entgegen dieser Erkenntnisse konnten Jiang et al. [72] wiederum für intestinale Epithelzellen zeigen, dass Galektin-3 an Desmoglein-2 bindet, dieses an der Zelloberfläche stabilisiert und dadurch für die Aufrechterhaltung der homotypischen interzellulären Kontakte sorgt. Eine verminderte Migration durch exogene Zugabe von Galektin-3 zeigte sich zudem bei den humanen kolorektalen Tumorzelllinien HCT-15, LoVo, DLD-1, CoLo201 [73]. Dagegen reagierten die humanen Kolonkarzinomzelllinien Caco2 und DLD-1 mit einer reduzierten Migration und verminderter Sekretion von Galektin-3 auf einen shRNA-vermittelten, stabilen *Knockdown* von Galektin-3. Die Zugabe von rekombinantem Galektin-3 hob diese Effekte wieder auf [74].

Die Bedeutung von Galektin-3 für die Migration von (Tumor-)Zellen scheint demzufolge von der jeweiligen Entität bzw. Organsystem abzuhängen. Liu und Rabinovich [21] vermuten, dass diese Unterschiede auf verschiedene Zelloberflächen-Rezeptoren zurückzuführen sind, mit denen Galektin-3 interagiert [21], d.h. auf Zelltyp-spezifische Rezeptor-Expressionsmuster.

Eine methodische Schwäche der *Wound-healing-Assays* besteht in den Schwankungen in der Spaltbreite, die das Migrationsverhalten der PDAC-Zellen - möglicherweise durch verminderte Wirkung von Chemokinen bei größerer Distanz - beeinflussen und somit Ergebnisse und Aussage verzerren können. Zudem handelt es sich bei den *Wound-healing-Assays* um ein Modell, bei dem das Verhalten jeweils einer Zelllinie auf Kunststoff und isoliert untersucht wird und das sich insofern erheblich von den Bedingungen im menschlichen Organismus unterscheidet. Die von uns erzielten Befunde deuten in der Zusammenschau nicht auf eine Beteiligung von Galektin-3 an den Migrationsprozessen des PDAC hin. Eine Validierung der Ergebnisse mittels weiterer Methoden zur Analyse des Migrationsverhaltens wie z.B. *xCelligence*-Echtzeitanalyse oder der *Boyden-Kammer-Assay* wäre jedoch sinnvoll.

Ferner könnte analog zu den Untersuchungen von Wu et al. [74] an humanen Kolonkarzinomzelllinien die Wirkung von exogen zugegebenem, rekombinantem Galektin-3 auf das Migrationsverhalten von PDAC-Zellen analysiert werden.

5.2 Die Bedeutung von Galektin-3 für die Adhäsion von PDAC-Zellen an Leberendothelzellen

Im Weiteren wurde die Bedeutung von Galektin-3 für Prozesse der Adhäsion an Leberendothel mittels *Adhäsionsassays* untersucht. Dazu erfolgte zunächst ein transients siRNA-vermittelter *Knockdown* von Galektin-3. Der *Knockdown* von Galektin-3 führte in beiden Zelllinien zu einer Reduktion der Adhäsion an die Leberendothel-Zelllinie TMNK-1. Bei PancTu1-Zellen betrug die Verminderung der Adhäsion im Mittel 10,2 %, bei Panc1-Zellen 28,5 %. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Galektin-3 an den Prozessen der Adhäsion von PDAC-Zellen an Leberendothelzellen beteiligt ist. Da die Reduktion

jedoch eher moderat war, spielen dabei möglicherweise noch andere Mechanismen und/ oder weitere Galektine eine Rolle.

Ähnliche Befunde zeigten sich für andere Tumorentitäten: So detektierten Khaldoyanidi et al. [38] bei der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-435 mit hohem Metastasierungspotenzial eine höhere Galektin-3-Expression, verbunden mit einer verstärkten Adhäsion an humane Nabelschnur-endothelzellen (HUVEC-Zellen) im Vergleich zu der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-468 ohne Metastasierungspotenzial und mit geringer Galektin-3-Expression. An der Oberfläche der Endothelzellen kommt es durch Interaktion mit MDA-MB-435 zu einer deutlich erhöhten Präsenz von Galektin-3. Anhand von Konfokal-Mikroskopie konnten Khaldoyanidi et al. [38] zeigen, dass unter Fluss-Bedingungen eine Interaktion zwischen Galektin-3 aus den Endothelzellen und Thomsen-Friedenreich-Antigen (TF-Antigen) auf den Mammakarzinom-Zellen stattfindet (heterotypische Adhäsion). Die homotypische Adhäsion zwischen Mammakarzinom-Zellen wird von Galektin-3 auf der Oberfläche dieser Zellen vermittelt. Im Gegensatz zur HUVEC-Zelllinie und PDAC-Zellen exprimiert die TMNK-1-Zelllinie kaum Galektin-3. Die unterschiedliche Galektin-3-Expression der Endothelzellen unterschiedlicher Organsysteme könnte daher ein Einflussfaktor für das organspezifische *Homing* von Tumorzellen sein.

Darüber hinaus zeigten Khaldoyanidi et al. [38], dass sich die Adhäsion der Mammakarzinom-Zellen an Endothelzellen mithilfe des Peptids Laktulosyl-L-Leucin, das an Galektin-3 bindet, hemmen lässt (vgl. hierzu auch die Bindungsstudien über die Bindung zwischen Laktulose und der CRD-Domäne von Galektin-3 durch Kishor et al. [75]). Zou et al. [40] ermittelten ebenfalls unter Nutzung der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-435, dass die CRD des Galektin-3 für die Vermittlung der Adhäsion verantwortlich ist. Durch spezifische Blockade dieser Domäne mittels eines Peptids ließ sich die Adhäsion von Mammakarzinom- an Endothelzellen hemmen. Laut Cao et al. [42] kann die adhäsionsvermittelnde Funktion bei der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3M und der humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549 sowohl durch endogenes als auch durch exogenes Galektin-3 vermittelt werden. Yu et al. [41] stellten ein ähnliches Adhäsionsverhalten bei der humanen Mammakarzinom-Zelllinie ZR-75-1 und der Kolonkarzinom-Zelllinie HT29-5F7 fest, die beide MUC1 exprimieren. Mit zunehmender Konzentration von rekombinantem Galektin-3 (bis zu 1,2 µg/ml), mit dem die Karzinomzellen für eine Dauer von 30 Minuten vorbehandelt wurden, stieg das Adhäsionspotenzial der Karzinomzellen an HUVEC-Zellen. Rekombinantes Galektin-3 führte in weiteren Untersuchungen von Yu et al. [41] zudem zu einer verstärkten Adhäsion der humanen Mammaepithel-Zelllinie HCA1,7, wenn in dieser eine MUC1-TF-Antigen-Expression induziert wurde. Mechanistisch wurden diese Effekte mit einer Interaktion von zirkulierendem Galektin-3 mit dem TF-Antigen auf zelloberflächen-ständigem MUC1 erklärt, durch die es zu einer Polarisierung der MUC1-Hülle und einer folgenden Freilegung kleinerer Adhäsionsmoleküle und Liganden (u.a. CD44) auf der Oberfläche der Tumorzellen und verstärkter Adhäsion

komme [41]. An der humanen Melanom-Zelllinie A375 zeigten Zhao et al. [44] *in vivo* und *in vitro*, dass eine induzierte MUC1-Expression protektiv vor Metastasen wirkt. Die protektive Wirkung der MUC1-Hülle wurde jedoch durch erhöhte Konzentrationen an zirkulierendem Galektin-3 (> 100 ng/ml) aufgehoben. Mit Melanomzellen inokulierte, athymische Mäuse überlebten länger, wenn die Melanomzellen MUC1 exprimierten. Eine Behandlung der MUC1-exprimierenden Melanomzellen mit Galektin-3 vor der Inokulation in die Mäuse senkte die Überlebensrate der Mäuse im Vergleich zu Mäusen, die mit MUC1-exprimierenden, nicht-Galektin-3-vorbehandelten Melanomzellen inokuliert wurden. Auch *in vitro* konnten Zhao et al. [44] zeigen, dass eine MUC1-Induktion in Melanomzellen zu einer verminderten Adhäsion an HUVEC-Zellen führt, wohingegen eine Vorbehandlung der Melanomzellen mit Galektin-3 in der Konzentration von 1 µg/ml zu einer verstärkten Adhäsion an Endothelzellen führt.

Dass Khaldoyanidi et al. [38] die Bedeutung von Galektin-3 für die Adhäsion von Mammakarzinom- an Endothelzellen unter fließenden Bedingungen untersuchten, ist ein entscheidender Unterschied zu unseren Untersuchungen, bei denen sich die Karzinomzellen während der Adhärenzzeit statisch in Suspension befanden. Da fließende Bedingungen den Verhältnissen im menschlichen Organismus, in dem sich die Karzinomzellen in der Blutzirkulation befinden, näher kommen, sollten entsprechende Assays auch mit PDAC-Zelllinien durchgeführt werden.

In Analysen unserer Arbeitsgruppe zeigte sich durchflusszytometrisch eine verminderte Expression von Galektin-3 an der Zelloberfläche von PDAC-Zellen nach enzymatischer Ablösung, die für die Durchführung der *Adhäsionsassays* notwendig ist. Dies kann eine Erklärung dafür sein, warum nur eine partielle Reduktion der Adhäsion von PDAC-Zellen unter *Knockdown* von Galektin-3 zu beobachten war. Wäre ein experimentelles Design unter Erhalt des Zelloberflächen-ständigen Galektin-3 auf PDAC-Zellen möglich, so sollte auch in diesem Kontext untersucht werden, ob die Interaktion mit PDAC-Zellen Galektin-3 an die Oberfläche der Leberendothelzellen mobilisiert. Außerdem ließe sich auf diese Weise klären, wo Galektin-3 während der Adhäsionsprozesse auf beiden Zelltypen lokalisiert ist. In dem von uns verwendeten Design der *Adhäsionsassays* lassen sich Einflüsse auf die membranständige Präsenz von Galektin-3 durch das enzymatische Ablösen der Zellen, trotz der – verglichen mit Trypsin-Lösung – schonenderen Verwendung von Accutase-Lösung, nicht ausschließen. Hierzu sind weitere Untersuchungen geplant.

In den verwendeten *Adhäsionsassays* gibt es einige Faktoren (z.B. das *CFSE-Labeling*, die Zellzahlbestimmung, die Waschschrte sowie die Lyse der Zellen), durch die es beispielsweise zu Schwankungen der Menge des aufgenommenen *CFSE*-Farbstoffs zwischen den Zellen oder zu Schwankungen der Anzahl intakter gefärbter Zellen kommen kann. Daher sollten die Befunde in einem weiteren Testsystem validiert werden.

Eine adhäsionsfördernde Wirkung auf die MUC1-exprimierende humane Mammakarzinom-Zelllinie ZR-75-1 und die MUC1-exprimierende humane Kolonkarzinom-Zelllinie HT29-5F7 scheint nach Chen et al. [45] ein erhöhter Spiegel an zirkulierendem Galektin-3 (Konzentrationen von 0,2 bis 1 µg/ml) zu haben (vgl. auch Diskussion S. 45/46: Untersuchungen von Yu et al. [41]). Es kommt dabei zu einer Sekretion der autokrin und parakrin wirksamen Zytokine wie IL-6, G-CSF, sICAM-1 und GM-CSF durch humane pulmonale Endothelzellen (HMVEC-Zellen). Dadurch exprimieren diese vermehrt Adhäsionsvermittelnde Moleküle an ihrer Zelloberfläche, wie z.B. Integrin $\alpha_v\beta_1$, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1, wodurch die Interaktionen zwischen Krebszellen und Endothelzellen auch gefördert werden [45].

Auf die Möglichkeit, dass von Tumorzellen sezernierte Galektine Gegenteilig, d.h. adhäsionshemmend wirken können, weisen Liu und Rabinovich [21] hin. Durch Bindung der Galektine an Adhäsionsmoleküle oder sterische Abschirmung kann es zu einer Hemmung der interzellulären Adhäsion und der Adhäsion von Tumorzellen an extrazelluläre Matrices kommen [21]. Auch Ochieng et al. [76] stellten eine reduzierte Adhäsion an die EZM-Proteine Laminin, Kollagen-IV und Fibronektin durch Behandlung der humanen Mammakarzinom-Zelllinie 11-9-1-4, der humanen Fibrosarkom-Zelllinie HT-1080, der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 und der murinen Spindelzellkarzinom-Zelllinie A5 mit exogenem Galektin-3 (bis zu 100 µg/ml) fest. Inwieweit die Effekte von exogen hinzugefügtem Galektin-3 *in vitro* auf Vorgänge *in vivo* übertragbar sind, bleibt zu klären.

Margadant et al. [77] weisen am Beispiel von Galektin-8 auf die verschiedenen Funktionen hin, die gelöste Galektine im Gegensatz zu Oberflächen-assoziierten oder an die EZM gebundenen Galektinen innehaben. Gelöstes Galektin-8 erwies sich als adhäsionsmindernd, während an die EZM gebundenes Galektin-8 auf HeLa-Zellen adhäsionsfördernd wirkte [78]. Auf CHO-P- (*Chinese hamster ovary cells*), HeLa- und HaCaT-Zellen (humane Keratinozyten) bewirke gelöstes Galektin-8 eine Adhäsions-Hemmung [77, 78], wohingegen es die Adhäsion von Neutrophilen unterstütze [77, 79].

Gewebe- bzw. Zell-spezifische Unterschiede im Glykosylierungs-Muster seiner Liganden erklären das variierende Bindungsverhalten von Galektinen [43, 77, 80]. Durch differenzielle, von der Tumor-Mikro-umgebung abhängige, Sialylierung von MUC1 wird beispielsweise die Galektin-3-vermittelte Adhäsion beeinflusst [81]. Die Bindungsaffinität steigt mit zunehmender Zahl an Verzweigungen der Polysaccharide bzw. der N-Acetyllaktosamin-Gruppen und wird auch von benachbarten Sacchariden beeinflusst [43, 77, 80]. Wildtyp-Galektin-3 verfügt über Bindestrukturen, die für die Erkennung komplexerer Kohlenhydrate im Unterschied zu einfachen Sacchariden wie Laktose zuständig sind und im Falle einer Mutation verloren gehen können. Darüber hinaus wird die Adhäsion durch das Verhältnis der Galektine zu Rezeptor-Glykoproteinen und durch den Oligomerisierungs-Status der Galektine beeinflusst [43].

Unsere Analysen zeigten eine membranständige Galektin-3-Expression in den untersuchten PDAC-Zellen. Ob Galektin-3 von den PDAC-Zellen sezerniert wird und sich folglich auch im löslichen Überstand befindet, wurde noch nicht analysiert. Dazu wäre es sinnvoll, eine mögliche Sekretion von Galektin-3 durch PDAC-Zellen mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) der Zellüberstände zu detektieren. Der Nachweis einer Galektin-3-Sekretion *in vitro* wäre ein Indiz dafür, dass die erhöhten Serumspiegel an Galektin-3, wie sie u.a. von Xie et al. [10] bei PDAC-Patienten nachgewiesen wurden, auf PDAC-Zellen zurückzuführen sind (siehe Kapitel 1.2.3). In Anlehnung an die Untersuchungen von Chen et al. [45] könnte die Wirkung von zirkulierendem Galektin-3 auf die Leberendothel-Zelllinie TMNK-1 ebenfalls analysiert werden.

Analysen an der murinen epithelialen, β 1-Integrin-defizienten Zelllinie GE11 sowie der murinen Keratinozyten-Zelllinie MK α 3 konnten zeigen, dass die Galektin-3-Expression auch epigenetisch reguliert werden kann und nicht nur der Steuerung durch den RhoA-Signalweg sowie Signalwege, in die Proteinkinase C, p38MAPK, ERK-1/2, PI3K und Src-Kinasen involviert sind, unterliegt [77]. Laut dieser Studie kommt es zu folgendem Feedback-Mechanismus: Die Expression von β 1-Integrinen im Zuge der β 1-induzierten EMT bewirkt über DNA-Demethylierung des Lgals3-Promoters eine Induktion der Galektin-3-Expression. Diese wiederum fördert die durch β 1-Integrin vermittelte Zell-Adhäsion an Fibronektin, Laminin und Kollagen-1, genauso wie die Zell-Migration.

Ähnlich dieser Erkenntnisse beschreiben Ramasamy et al. [82] eine epigenetische Regulation der Galektin-3-Expression durch glykosyliertes MUC1 über miRNA, indem MUC1 die miRNA miR-322 supprimiert und dadurch Galektin-3-mRNA stabilisiert. Galektin-3 wiederum bindet an MUC1 und ist an EGF-vermittelten Interaktionen zwischen MUC1 und EGFR beteiligt. Beide Mechanismen sind Teil eines Regelkreises.

5.3 Die Wirkung pflanzlicher Polysaccharide auf das Adhäsionspotenzial der PDAC-Zellen an Leberendothel und die Galektin-3-vermittelte Signaltransduktion

Eine potenziell adhäsionshemmende Wirkung der pflanzlichen Polysaccharide wurde mittels *Adhäsionsassays* untersucht, bei denen die Behandlung der PDAC-Zellen einerseits für 90 Minuten während der Adhäsionszeit (siehe Kapitel 4.3.3, Kurzzeit-Inkubation), andererseits zusätzlich noch für eine Dauer von 72 Stunden als Vorbehandlung vor dem Assay erfolgte (siehe Kapitel 4.3.5, Langzeit-Inkubation).

Mittels Kurzzeit-Inkubation ließ sich die Adhäsion der PancTu1-Zellen an Leberendothelzellen am deutlichsten mit AGP-TFA reduzieren. Hier betrug die Verminderung der Adhäsion 17,5 % im Vergleich zur

unbehandelten Kontrolle. Bei Panc1-Zellen lag die effektivste Reduktion des Adhäsionspotenzials mit MCP-Pek sogar bei 45 %.

Zur Klärung der Frage, ob die adhäsionshemmende Wirkung durch Galektin-3 vermittelt wird, wurde zudem das Adhäsionspotenzial der Panc1-Zellen nach Behandlung mit den wirksamsten pflanzlichen Polysacchariden MCP-Pek bzw. AGP-TFA unter *Knockdown* von Galektin-3 untersucht (siehe Kapitel 4.3.4). Dabei zeigte sich keine signifikante zusätzliche adhäsionsmindernde Wirkung durch die Behandlung mit den pflanzlichen Polysacchariden: Im Vergleich zur Kontrolle (siGal3 ohne Zusatz pflanzlicher Polysaccharide während des Assays) war die Adhäsion nach Behandlung mit MCP-Pek um 8,4 % vermindert, nach Behandlung mit AGP-TFA um 12,4 %.

Dies legt den Schluss nahe, dass die adhäsionsmindernde Wirkung der pflanzlichen Polysaccharide zum Teil über Galektin-3 vermittelt wird. Der geringe adhäsionsreduzierende Effekt der pflanzlichen Polysaccharide unter *Knockdown* von Galektin-3 könnte jedoch auf eine Interaktion der Polysaccharide mit anderen Galektin-Subtypen zurückzuführen sein.

Die Interaktion von pflanzlichen Polysacchariden mit Galektinen wurden bereits in zahlreichen Studien untersucht: Satisha et al. [83] betonten die Bedeutung der Saccharide Arabinose und Galaktose als Bestandteile von Pektinen für deren Galektin-3-Inhibitionspotenzial. Eine spezifische Bindung zwischen terminaler Galaktose an neutralen Polysaccharid-Seitenketten (am Rhamnogalakturonan 1-Rückgrat) aus Kartoffelpektin und Galektin-3 konnte von Gunning et al. [84, 85] mittels Fluoreszenz-Mikroskopie, Durchflusszytometrie und *Force Spectroscopy* nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich auch, dass Polygalakturonsäure-Fragmente aus Kartoffelpektin keine spezifische Bindung mit Galektin-3 eingehen [84].

Cui et al. analysierten, dass Pektin aus *Panax ginseng* unter anderen Polysaccharide des Typs Rhamnogalakturonan I enthält, das über Arabinan-, Galaktan-, Arabinogalaktan I- und Arabinogalaktan II-Seitenketten verfügt. Diese gehen starke Bindungen mit Galektin-3 ein, wohingegen ebenfalls in RN1 enthaltene Polysaccharide des Typs Homogalakturonan in Verbindung mit Rhamnogalakturonan II schwächere oder keine Bindungen mit Galektin-3 ausbilden [86].

Untersuchungen von Zhang et al. [87] ergaben, dass ein spezifisches Verhältnis von Homogalakturonan 2b und 3p zu Rhamnogalakturonan 2a aus Zitruspektin zu einer starken Bindung an Galektin-3 führt. Möglicherweise interagieren die Polysaccharide miteinander und begünstigen die starke Bindung durch Änderung ihrer Konformation. Es handelt sich dabei um eine vom pH-Wert unabhängige Bindung, die stärker als unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen ist [87]. Die chemische Modifikation von Pektin ist dabei für die Interaktion mit Galektin-3 von großer Bedeutung, was durch die

fehlende Interaktionsfähigkeit von unmodifiziertem Pektin deutlich wird, das größer als MCP ist und komplexere Seitenketten besitzt [88].

Im Hinblick auf das Inhibitions Potenzial pflanzlicher Arabinogalaktane auf Galektin-3, das bislang deutlich weniger untersucht ist, konnten Zhang et al. [12] zeigen, dass das Arabinogalaktan RN1 aus *Panax notoginseng* an Galektin-3 bindet. Darüber hinaus hemmte eine Behandlung mit RN1 das Wachstum der PDAC-Zelllinien AsPC-1 und BxPC-3 dosisabhängig und führte bei einer oralen Aufnahme in der Dosierung von 20 mg/kg zu einem verminderten Tumorwachstum *in vivo*. RN1 enthält terminale Arabinose und terminale Galaktose [12].

Die Langzeit-Inkubation mit den pflanzlichen Polysacchariden MCP-Pek und AGP-TFA, mit denen bei Kurzzeit-Inkubation eine deutliche adhäsionsmindernde Wirkung erzielt wurde (siehe Kapitel 4.3.3), führte im Gegensatz dazu zu einer Zunahme des Adhäsionspotenzials der PancTu1-Zellen an Leberendothelzellen (siehe Kapitel 4.3.5). Für MCP-Pek lag die Verstärkung der Adhäsion bei 51,8 %, für AGP-TFA bei 79,1 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Da als Erklärung dieser divergenten Ergebnisse Veränderungen der Proteinexpression innerhalb der Galektin-3-vermittelten Signaltransduktion vermutet wurden, wurden *Westernblots* mit Ganzzelllysaten nach 72-stündiger Behandlung mit den pflanzlichen Polysacchariden durchgeführt (siehe Kapitel 4.3.6). Bei PancTu1-Zellen ließ sich eine Verminderung der Galektin-3- und pAKT-Expression insbesondere nach Behandlung mit AGP-EPP und AGP-TFA beobachten, ERK und p-ERK waren verstärkt, Rac1b unverändert exprimiert. Die Expression von Galektin-3, ERK und p-ERK blieb bei Panc1-Zellen unverändert, während pAKT verstärkt exprimiert und Rac1b supprimiert wurde.

Eine reduzierte Expression von Galektin-3 und pAKT stellten Fang et al. [89] nach Behandlung der humanen Harnblasenkarzinom-Zelllinien T24 und J82 mit MCP fest. Sie beobachteten zudem ein signifikant reduziertes Tumorwachstum nach oraler Applikation von MCP in mit T24 inokulierten Mäusen [89]. In dieser Doktorarbeit zeigte dagegen die Behandlung mit MCP kein bzw. nur einen geringen Einfluss auf die Galektin-3- und pAKT-Expression in PancTu1-Zellen. Stärkere Effekte wurden mit der Behandlung mit AGP-EPP und AGP-TFA erzielt. Die Bedeutung der verminderten pAKT-Expression für das Zellwachstum wurde hier nicht untersucht, jedoch konnte eine verstärkte Adhäsion beobachtet werden (siehe Kapitel 4.3.5).

Ein transients siRNA-vermittelter *Knockdown* von Galektin-3 führte in Untersuchungen von Kobayashi et al. [60] bei Panc1-Zellen zu einer Verminderung der Expression von pAKT und GSK-3 β sowie in der Folge von β -Catenin, wodurch die Invasion von Tumorzellen reduziert wurde. Zudem kam es zu einer

reduzierten Expression der Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2). In ihren Untersuchungen hatte sich ein vermindertes Invasionsverhalten der humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien Panc1, AsPC-1 und BxPC-3 gezeigt (siehe Kapitel 5.1). Daraus folgern die Autoren, dass die Galektin-3-vermittelte Invasion bei Pankreaskarzinomzellen durch die Phosphorylierung von AKT initiiert wird. Die Expression von pAKT war in ihren Analysen nach 24 Stunden am deutlichsten vermindert, wohingegen sich eine vermehrte Expression desselben nach 48-stündiger Transfektion zeigte [60].

Die in unseren Untersuchungen nach 72-stündiger Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden beobachtete verminderte Expression von pAKT in PancTu1-Zellen bei gleichzeitig verstärktem Adhäsionsverhalten passt somit zu dem von Kobayashi et al. [60] beschriebenen verminderten Invasionsverhalten bei reduzierter pAKT-Expression. Dies gilt unter der Annahme, dass sich Invasion und Adhäsion gegensätzlich verhalten. Die vermehrte Expression von pAKT in Panc1-Zellen nach Behandlung mit AGPs legt die Vermutung nahe, dass diese Zelllinie ein verstärktes Invasionsverhalten und vermindertes Adhäsionsverhalten zeigen könnte, worüber weiterführende Untersuchungen Aufschluss geben sollten.

Nach Analysen von Gao et al. [71] kommt es durch Bindung von exogenem Galektin-3 an HeLa-Zellen zu einer Phosphorylierung von ERK1/2, intrazellulär aktivierten Kalzium-Ionen und schließlich zur Aktivierung von PKC, die Raf-1 oder MEK1/2 phosphoryliert [71]. Zudem vermittelt FAK eine durch p-ERK1/2 induzierte Phosphorylierung von Paxillin. All diese Prozesse wirken migrationsfördernd. AKT wird durch Bindung von exogenem Galektin-3 allerdings in dieser Studie nicht aktiviert [71].

Anders als bei Gao et al. [71] wurde in dieser Doktorarbeit nicht die Wirkung von exogenem Galektin-3 auf Galektin-3-vermittelte Signalwege, sondern der Effekt einer 72-stündigen Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden untersucht: Dabei adhärten PancTu1-Zellen verstärkt an Leberendothelzellen und es kam zu einer erhöhten Expression von ERK und p-ERK in PancTu1-Zellen. Folglich scheint phosphoryliertes (aktiviertes) ERK sowohl für Migrations- als auch für Adhäsionsprozesse eine Rolle zu spielen.

Die Rho-GTPase Rac1 wirkt pro-migratorisch, indem sie die Bildung von Lamellipodien und Filopodien initiieren und somit einen Umbau des Zytoskeletts fördern kann [62]. Dagegen reguliert Rac1b die TGF- β 1-induzierte Migration negativ. Für Rac1b (Rho-GTPase) wird zusätzlich eine negative Regulation der Rac1-Aktivität beschrieben. Die Relation von Rac1 zu Rac1b ist an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sowie in der Folge an der Regulation von Zell-Morphologie und -Motilität. Ferner vermuten Melzer et al. eine Beteiligung von Rac1 an der Steuerung der TGF- β 1-abhängigen EMT, wobei Rac1b die EMT vermutlich nicht fördert [62].

Ob auch die Migrationsfähigkeit unter diesen Bedingungen gesteigert ist, sollte mittels *Migrationsassays* nach Langzeit-Behandlung mit den pflanzlichen Polysacchariden überprüft werden (bei unseren Assays erfolgte die Inkubation für 24 Stunden während des Assays, siehe Kapitel 3.4 und 4.2.2). Sollten sich diese Vermutungen bestätigen, würde die Behandlung mit den pflanzlichen Polysacchariden durch Verstärkung von Migration und Invasion die Entstehung von Metastasen eher fördern, anstatt sie zu inhibieren.

5.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend legen unsere Ergebnisse nahe, dass Galektin-3 nicht an der Migration von PDAC-Zellen, wohl aber an der Adhäsion dieser an Leberendothelzellen beteiligt ist. Weitergehende Untersuchungen wären zur Klärung des Zusammenwirkens verschiedener Galektine, von Galektinen und MUC1 sowie der Regulationsmechanismen der Galektin-Expression sinnvoll. Dabei sind eine differenzierte Analyse der Galektin-Lokalisierung und ihre davon abhängige Funktion von großer Bedeutung.

Bislang wurde die Expression von Galektin-3 in Primärtumoren, lokoregionären Mikro- und Lymphknotenmetastasen sowie im Serum von PDAC-Patienten, Patienten mit benignen Erkrankungen des Pankreas und gesunden Probanden untersucht (siehe Kapitel 1.2.3 und 1.4). Als Voraussetzung für eine eventuelle therapeutische Applikation eines Galektin-3-Inhibitors wäre jedoch darüber hinaus eine Untersuchung hepatischer Fernmetastasen im Hinblick auf ihre Galektin-3-Expression wichtig.

Schließlich ist fraglich, ob Untersuchungen an Zelllinien mit membran-ständiger Galektin-3-Expression den pathophysiologischen Verhältnissen nahe kommen oder ob nicht auch eine mögliche Sekretion von Galektin-3 durch Tumorzellen, Tumor-infiltrierende Makrophagen oder Lymphozyten mit berücksichtigt und analysiert werden sollte. Gaida et al. stellten eine Galektin-3-Expression in Tumor-infiltrierenden Zellen fest und detektierten eine Reduktion der Galektin-3-Konzentration im Serum von PDAC-Patienten nach chirurgischer Resektion der Tumore, weshalb sie eine Galektin-3-Sekretion durch die Tumore für möglich halten [34]. Dies zeigt, wie komplex die pathophysiologischen Mechanismen *in vivo* sind und verdeutlicht die Notwendigkeit, die Interaktionen mit der Tumor-Mikroumgebung weiter aufzuschlüsseln [11, 81]. Abgesehen von den Prozessen der Migration und Adhäsion besteht beispielsweise ebenso bei den Prozessen der Intra- und Extravasation Forschungsbedarf. Methodisch könnten hierzu zunächst *Extravasationsassays* zum Einsatz kommen wie der von Penny et al. [90] angewandte, bei dem Makrophagen und Tumorzellen durch mit Fibronektin und Endothelzellen (GFP-HUVEC) ausgekleidete Kanäle hindurch extravadierten. Weitere Studien zur Identifizierung der Umgebungsstimuli, die die differenzielle Expression von Galektin-3 und seiner Liganden regulieren, sind ebenfalls notwendig [81].

Zum Einen besteht Bedarf an therapeutisch nutzbaren Zielstrukturen und spezifischen Inhibitoren derselben, um Mikrometastasen erfolgreich bekämpfen und das Auswachsen von Metastasen aus zirkulierenden Tumorzellen zu verhindern. Zum Anderen werden spezifische Marker für die Früherkennung von malignen Erkrankungen des Pankreas benötigt [11]. Xie et al. schlagen eine Bestimmung von Galektin-3 in Kombination mit *Carcinoembryonic antigen* (CEA) und *Carbohydrate antigen 19-9* (CA 19-9) für ein Screening auf Pankreaskarzinome vor [10]. Dagegen halten Gaida et al. die Verwendung von Serum-Galektin-3 als Biomarker nicht für sinnvoll, da bei lediglich 88 % der von ihnen untersuchten PDAC-Patienten Galektin-3 im Serum detektiert wurde [34].

Die genauere Analyse des Zusammenspiels der verschiedenen Galektin-Subtypen im PDAC könnte therapeutisch nutzbare Ergebnisse liefern, wie beispielsweise die Anwendung einer Kombination verschiedener Galektin-Inhibitoren. Sollte sich in weiteren funktionellen Analysen des Adhäsionsverhaltens von PDAC-Zellen an Leberendothel eine bedeutende Rolle von Galektin-3 bestätigen lassen, wäre der Einsatz eines lokal applizierten, adjuvanten Galektin-3-Inhibitors möglich.

6 Zusammenfassung

Trotz langjähriger Forschung sind Pathogenese und Metastasierungsmechanismen des duktales Pankreasadenokarzinoms (PDAC) noch immer unzureichend verstanden. Verlässliche Marker, die zur Diagnose des PDAC in früheren Erkrankungsstadien führen könnten, sowie molekulare Angriffspunkte für zielgerichtete Therapieverfahren werden dringend benötigt, um die Prognose der Erkrankung entscheidend zu verbessern.

Da die Leber die häufigste Lokalisation von Metastasen darstellt, wurden die hepatischen Metastasierungsmechanismen in den Fokus dieser Arbeit genommen. Im Speziellen wurde die Bedeutung von Galektin-3, welches im PDAC im Vergleich zum peritumoralen Stroma erhöht exprimiert wird und für das bereits eine Rolle in der Zellmigration und -adhäsion beschrieben wurde, mittels Zellkultur-basierter *Migrations-* und *Adhäsionsassays* untersucht. Hierzu wurden die PDAC-Zelllinien PancTu1 und Panc1 sowie die Leberendothel-Zelllinie TMNK-1 verwendet. Zudem wurde das Inhibitions Potenzial der pflanzlichen Polysaccharide Modifiziertes Zitruspektin und Arabinogalaktan aus *Echinacea purpurea* (neben prozessierten Formen derselben) auf das Migrations- und Adhäsionsverhalten der PDAC-Zelllinien sowie deren Wirkung auf die Galektin-3 vermittelte Signaltransduktion auf Ebene der Proteinexpression analysiert.

Eine migrationsfördernde Wirkung von Galektin-3 ließ sich für die untersuchten PDAC-Zelllinien PancTu1 und Panc1 nicht nachweisen, da ein transients siRNA-vermittelter *Knockdown* von Galektin-3 das Migrationspotenzial nicht beeinflusste. Weiterhin zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der Migration durch Behandlung mit untersuchten pflanzlichen Polysacchariden.

Im Hinblick auf das Adhäsionsverhalten der PDAC-Zellen führte ein transients siRNA-vermittelter *Knockdown* von Galektin-3 zu einer Reduktion der Adhäsion der PDAC-Zellen an TMNK-1-Zellen. Zudem ließ sich die Adhäsion der Panc1-Zellen an Leberendothelzellen mit den pflanzlichen Polysacchariden reduzieren, wobei die adhäsions-mindernde Wirkung vermutlich teilweise Galektin-3-abhängig ist: Nach transientem *Knockdown* von Galektin-3 kam es zu keiner signifikanten zusätzlichen adhäsions-reduzierenden Wirkung durch Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden. Auch die Behandlung über einen verlängerten Zeitraum bewirkte keinen adhäsions-mindernden Effekt, sondern führte im Gegenteil zu einer verstärkten Adhäsion der PancTu1-Zellen an TMNK-1-Zellen.

In Zusammenschau mit der Literatur weisen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit auf eine Beteiligung von Galektin-3 an den Adhäsionsprozessen beim PDAC hin, nicht jedoch an Migrationsprozessen. Die untersuchten pflanzlichen Polysaccharide Modifiziertes Zitruspektin und Arabinogalaktan aus *Echi-*

nacea purpurea, vor allem jedoch ihre prozessierten (kleineren) Formen, zeigen teilweise eine adhäsions-mindernde Wirkung. Diese ist allerdings von der Galektin-3-Expression und der Applikationsdauer abhängig. Das intra- und extrazelluläre Vorkommen von Galektin-3, auch in Kombination mit anderen Galektin-Subtypen, deren Bedeutung für weitere Metastasierungs-assoziierte Prozesse wie Intra- und Extravasation sowie die Rolle beim Gewebe-spezifischen *Homing* von Tumorzellen sollten weiter analysiert werden.

Aufgrund des ubiquitären Vorkommens und der multiplen Funktionen von Galektin-3 würde die Kombination einer Behandlung mit Polysacchariden mit Strategien für ein spezifisches *Targeting* eine interessante Therapieoption darstellen.

7 Literaturverzeichnis

1. Neuzillet, C., et al., *State of the art and future directions of pancreatic ductal adenocarcinoma therapy*. Pharmacology & Therapeutics, 2015. **155**: p. 80-104.
2. *World Cancer Report*, B.W.a.W. Stewart, Christopher P., Editor 2014, International Agency for Research on Cancer, WHO: Lyon, France. p. 632.
3. *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*, 2016, Robert Koch-Institut: Berlin. p. 274.
4. Sperti, C., et al., *Recurrence after Resection for Ductal Adenocarcinoma of the pancreas*. World Journal of Surgery, 1997. **21**: p. 195-200.
5. Chiaravalli, M., M. Reni, and E.M. O'Reilly, *Pancreatic ductal adenocarcinoma: State-of-the-art 2017 and new therapeutic strategies*. Cancer Treatment Reviews, 2017. **60**: p. 32-43.
6. Ryan, D.P., T.S. Hong, and N. Bardeesy, *Pancreatic Adenocarcinoma*. The New England Journal of Medicine, 2014. **371**: p. 1039-1049.
7. Alexakis, N., et al., *Current standards of surgery for pancreatic cancer*. British Journal of Surgery Society Ltd, 2004. **91**: p. 1410-1427.
8. Hilmi, M., L. Bartholin, and C. Neuzillet, *Immune therapies in pancreatic ductal adenocarcinoma: Where are we now?* World Journal of Gastroenterology, 2018. **24**(20): p. 2137-2151.
9. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, D.K.e.V.u.D.K.e.V., *S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0, 2013*, 2013.
10. Xie, L., et al., *The expressions and clinical significances of tissue and serum galectin-3 in pancreatic carcinoma*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2012. **138**(6): p. 1035-1043.
11. Chang, J.C. and M. Kundranda, *Novel Diagnostic and Predictive Biomarkers in Pancreatic Adenocarcinoma*. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(3): p. 667.
12. Zhang, L., et al., *RN1, a novel galectin-3 inhibitor, inhibits pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo via blocking galectin-3 associated signaling pathways*. Oncogene, 2017. **36**(9): p. 1297-1308.
13. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
14. Friedl, P. and S. Alexander, *Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity*. Cell, 2011. **147**(5): p. 992-1009.

15. Lambert, A.W., D.R. Pattabiraman, and R.A. Weinberg, *Emerging Biological Principles of Metastasis*. Cell, 2017. **168**(4): p. 670-691.
16. Houg, D.S. and M.F. Bijlsma, *The hepatic pre-metastatic niche in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Molecular Cancer, 2018. **17**(95).
17. Friedl, P., et al., *Classifying collective cancer cell invasion*. Nature Cell Biology, 2012. **14**(8): p. 777-783.
18. Hart, I.R., *New evidence for tumour embolism as a mode of metastasis*. Journal of Pathology, 2009. **219**: p. 275-276.
19. Hou, J.-M., et al., *Circulating Tumor Cells as a Window on Metastasis Biology in Lung Cancer*. The American Journal of Pathology, 2011. **178**(3): p. 989-996.
20. Fortuna-Costa, A., et al., *Extracellular Galectin-3 in Tumor Progression and Metastasis*. Frontiers in Oncology, 2014. **4**.
21. Liu, F.-T. and G.A. Rabinovich, *Galectins as modulators of tumour progression*. Nature Reviews Cancer, 2005. **5**(1): p. 29-41.
22. Thijssen, V.L., et al., *Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2015. **1855**(2): p. 235-247.
23. Funasaka, T., A. Raz, and P. Nangia-Makker, *Galectin-3 in angiogenesis and metastasis*. Glycobiology, 2014. **24**(10): p. 886-891.
24. Alge-Priglinger, C.S., et al., *Negative regulation of RPE cell attachment by carbohydrate-dependent cell surface binding of galectin-3 and inhibition of the ERK-MAPK pathway*. Biochimie, 2011. **93**(3): p. 477-488.
25. de Boer, R.A., et al., *Galectin-3: A Modifiable Risk Factor in Heart Failure*. Cardiovascular Drugs and Therapy, 2014. **28**(3): p. 237-246.
26. Glinisky, V.V. and A. Raz, *Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets*. Carbohydrate Research, 2009. **344**(14): p. 1788-1791.
27. Nangia-Makker, P., et al., *Inhibition of Human Cancer Cell Growth and Metastasis in Nude Mice by Oral Intake of Modified Citrus Pectin*. JNCI Journal of the National Cancer Institute, 2002. **94**(24): p. 1854-1862.
28. Iurisci, I., et al., *Synthetic Inhibitors of Galectin-1 and -3 selectively modulate homotypic cell aggregation and tumor cell apoptosis*. Anticancer Research, 2009. **29**: p. 403-410.
29. Chen, J.-H., et al., *Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in human pancreatic cancer tissue*. Hepatobiliary & pancreatic diseases international, 2009. **8**: p. 193-200.

30. Song, S., et al., *Overexpressed Galectin-3 in Pancreatic Cancer Induces Cell Proliferation and Invasion by Binding Ras and Activating Ras Signaling*. PLoS ONE, 2012. **7**(8): p. e42699.
31. Shimamura, T., et al., *Clinicopathological Significance of Galectin-3 Expression in Ductal Adenocarcinoma of the Pancreas*. Clinical Cancer Research, 2002. **8**: p. 2570-2575.
32. Berberat, P.O., et al., *Comparative Analysis of Galectins in Primary Tumors and Tumor Metastasis in Human Pancreatic Cancer*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2001. **49**(4): p. 539-549.
33. Schaffert, C., P.M. Pour, and W.G. Chaney, *Localization of Galectin-3 in Normal and Diseased Pancreatic Tissue*. International Journal of Pancreatology, 1998. **23**(1): p. 1-9.
34. Gaida, M.M., et al., *Expression of Galectin-3 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. Pathology & Oncology Research, 2011. **18**(2): p. 299-307.
35. Gonnermann, D., et al., *Galectin-3 Released by Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Suppresses $\gamma\delta$ T Cell Proliferation but Not Their Cytotoxicity*. Frontiers in Immunology, 2020. **11**.
36. Yu, L.-G., *Circulating galectin-3 in the bloodstream: An emerging promoter of cancer metastasis*. World Journal of Gastrointestinal Oncology, 2010. **2**(4): p. 177.
37. Inohara, H., et al., *Interactions between Galectin-3 and Mac-2-Binding Protein Mediate Cell-Cell Adhesion*. Cancer Research, 1996. **56**: p. 4530-4534.
38. Khaldoyanidi, S.K., et al., *MDA-MB-435 Human Breast Carcinoma Cell Homo- and Heterotypic Adhesion under Flow Conditions Is Mediated in Part by Thomsen-Friedenreich Antigen-Galectin-3 Interactions*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(6): p. 4127-4134.
39. Shekhar, M.P.V., et al., *Alterations in Galectin-3 Expression and Distribution Correlate with Breast Cancer Progression*. The American Journal of Pathology, 2004. **165**(6): p. 1931-1941.
40. Zou, J., *Peptides specific to the galectin-3 carbohydrate recognition domain inhibit metastasis-associated cancer cell adhesion*. Carcinogenesis, 2004. **26**(2): p. 309-318.
41. Yu, L.-G., et al., *Galectin-3 Interaction with Thomsen-Friedenreich Disaccharide on Cancer-associated MUC1 Causes Increased Cancer Cell Endothelial Adhesion*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(1): p. 773-781.
42. Cao, Z., et al., *Endogenous and exogenous galectin-3 promote the adhesion of tumor cells with low expression of MUC1 to HUVECs through upregulation of N-cadherin and CD44*. United States & Canadian Academy of Pathology, 2018.
43. Hughes, R.C., *Galectins as modulators of cell adhesion*. Biochimie, 2001. **83**: p. 667-676.

44. Zhao, Q., et al., *Circulating Galectin-3 Promotes Metastasis by Modifying MUC1 Localization on Cancer Cell Surface*. Cancer Research, 2009. **69**(17): p. 6799-6806.
45. Chen, C., et al., *Increased Circulation of Galectin-3 in Cancer Induces Secretion of Metastasis-Promoting Cytokines from Blood Vascular Endothelium*. Clinical Cancer Research, 2013. **19**(7): p. 1693-1704.
46. Classen, B., K. Witthohn, and W. Blaschek, *Characterization of an arabinogalactan-protein isolated from pressed juice of Echinacea purpurea by precipitation with the β -glucosyl Yariv reagent*. Carbohydrate Research, 2000. **327**: p. 497-504.
47. Perez, S., *A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function*. Biochimie, 2003. **85**(1-2): p. 109-121.
48. Cornelissen, B.e.a., *Translational molecular imaging in exocrine pancreatic cancer*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2018. **45**: p. 2442-2455.
49. Lenk, L., *Metastasis of Pancreatic Cancer: Influence of the hepatic microenvironment on the growth behavior of pancreatic ductal epithelial cells*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät 2017*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel: Kiel.
50. Matsumura, T., et al., *Establishment of an immortalized human-liver endothelial cell line with SV40T and hTERT*. Transplantation, 2004. **77**(9): p. 1357-1365.
51. Sipos, B., et al., *A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform*. Virchows Archiv, 2003. **442**: p. 444-452.
52. Lieber, M., et al., *Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas*. International Journal of Cancer, 1975. **15**: p. 741-747.
53. Moore, P.S., et al., *Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines*. Virchows Archiv, 2001. **439**(6): p. 798-802.
54. von Bülow, M., et al., *Establishment and characterization of continuous tumor cell lines from human pancreatic carcinoma in vivo*. Digestion, 1982. **25**.
55. Qian, J., et al., *In vitro modeling of human pancreatic duct epithelial cell transformation defines gene expression changes induced by k-ras oncogenic activation in pancreatic carcinogenesis*. Cancer Research, 2005. **65**(12): p. 5045-53.
56. Okabe, T., Y. Nozomi, and N. Ohsawa, *Establishment and Characterization of a Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Producing Cell Line from a Human Carcinoma of the Exocrine Pancreas*. Cancer 1983. **51**: p. 662-668.
57. Ruckert, M.T., et al., *Protein tyrosine phosphatases: promising targets in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2019. **76**(13): p. 2571-2592.

58. Shalom-Feuerstein, R., et al., *Galectin-3 Regulates a Molecular Switch from N-Ras to K-Ras Usage in Human Breast Carcinoma Cells*. Cancer Research, 2005. **65**(16): p. 7292-7300.
59. Xu, W.W., et al., *Syneprine Hydrochloride Suppresses Esophageal Cancer Tumor Growth and Metastatic Potential through Inhibition of Galectin-3-AKT/ERK Signaling*. Agricultural and Food Chemistry, 2018. **66**: p. 9248-9258.
60. Kobayashi, T., et al., *Transient gene silencing of galectin-3 suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion through degradation of β -catenin*. International Journal of Cancer, 2011. **129**(12): p. 2775-2786.
61. Ungefroren, H., et al., *Rac1b negatively regulates TGF- β 1-induced cell motility in pancreatic ductal epithelial cells by suppressing Smad signalling*. Oncotarget, 2014. **5**(1): p. 277-290.
62. Melzer, C., et al., *The role of TGF- β and its crosstalk with RAC1/RAC1b signaling in breast and pancreas carcinoma*. Cell Communication and Signaling, 2017. **15**(1).
63. Martins, R., G.J. Lithgow, and W. Link, *Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity*. Aging Cell, 2016. **15**: p. 196-207.
64. Ai, J., et al., *Overexpression of FoxO1 causes proliferation of cultured pancreatic β cells exposed to low nutrition*. Biochemistry, 2010. **49**: p. 218-225.
65. Hornsveld, M., et al., *Re-evaluating the role of FOXOs in cancer*. Seminars in Cancer Biology, 2018. **50**: p. 90-100.
66. Balan, V., P. Nangia-Makker, and A. Raz, *Galectins as Cancer Biomarkers*. Cancers, 2010. **2**(4): p. 592-610.
67. Weniger, M., K.C. Honselmann, and A.S. Liss, *The Extracellular Matrix and Pancreatic Cancer: A Complex Relationship*. Cancers, 2018. **10**(316).
68. Miller, M.C., et al., *Adhesion/growth-regulatory galectins tested in combination: evidence for formation of hybrids as heterodimers*. Biochemical Journal, 2018: p. BCJ20170658.
69. Boscher, C., et al., *Galectin-3 Protein Regulates Mobility of N-cadherin and GM1 Ganglioside at Cell-Cell Junctions of Mammary Carcinoma Cells*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(39): p. 32940-32952.
70. Le Marer, N. and R.C. Hughes, *Effects of the Carbohydrate-binding protein Galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells*. Journal of Cellular Physiology, 1996. **168**: p. 51-58.
71. Gao, X., et al., *Galectin-3 induces cell migration via a calcium-sensitive MAPK/ERK1/2 pathway*. Oncotarget, 2014. **5**(8): p. 2077-2084.

72. Jiang, K., et al., *Galectin-3 Regulates Desmoglein-2 and Intestinal Epithelial Intercellular Adhesion*. Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(15): p. 10510-10517.
73. Hittelet, A., et al., *Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration*. International Journal of Cancer, 2003. **103**(3): p. 370-379.
74. Wu, K.-L.e.a., *Extracellular galectin-3 facilitates colon cancer cell migration and is related to the epidermal growth factor receptor*. American Journal of Translational Research, 2018. **10**(8): p. 2402-2412.
75. Kishor, C., R.L. Ross, and H. Blanchard, *Lactulose as a novel template for anticancer drug development targeting galectins*. Chemical Biology & Drug Design, 2018. **92**(4): p. 1801-1808.
76. Ochieng, J., M.L. Leite-Browning, and P. Warfield, *Regulation of Cellular Adhesion to Extracellular Matrix Proteins by Galectin-3*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998. **246**: p. 788-791.
77. Margadant, C., et al., *Epigenetic Regulation of Galectin-3 Expression by β 1 Integrins Promotes Cell Adhesion and Migration*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(53): p. 44684-44693.
78. Levy, Y., et al., *Galectin-8 Functions as a Matricellular Modulator of Cell Adhesion*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(33): p. 31285-31295.
79. Nishi, N., et al., *Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin α M*. Glycobiology, 2003. **13**(11): p. 755-763.
80. Dennis, J.W., et al., *Adaptive Regulation at the Cell Surface by N-Glycosylation*. Traffic, 2009. **10**: p. 1569-1578.
81. Xin, M., X.-W. Dong, and X.-L. Guo, *Role of the interaction between galectin-3 and cell adhesion molecules in cancer metastasis*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2015. **69**: p. 179-185.
82. Ramasamy, S., et al., *the MUC1 and Galectin-3 Oncoproteins function in a MicroRNA-dependent regulatory loop*. Molecular Cell, 2007. **27**: p. 992-1004.
83. Sathisha, U.V., et al., *Inhibition of galectin-3 mediated cellular interactions by pectic polysaccharides from dietary sources*. Glycoconjugate Journal, 2007. **24**(8): p. 497-507.
84. Gunning, A.P., R.J.M. Bongaerts, and V.J. Morris, *Recognition of galactan components of pectin by galectin-3*. The FASEB Journal, 2009. **23**: p. 415-424.
85. Maxwell, E.G., et al., *Pectin – An emerging new bioactive food polysaccharide*. Trends in Food Science & Technology, 2012. **24**(2): p. 64-73.
86. Cui, L., et al., *Analysis of pectin from Panax ginseng flower buds and their binding activities to galectin-3*. International Journal of Biological Macromolecules, 2019. **128**: p. 459-467.

87. Zhang, T., et al., *Macromolecular assemblies of complex polysaccharides with galectin-3 and their synergistic effects on function*. Biochemical Journal, 2017. **474**(22): p. 3849-3868.
88. Nangia-Makker, P., et al., *Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents*. TRENDS in Molecular Medicine, 2002. **8**(4): p. 187-192.
89. Fang, T.e.a., *Modified citrus pectin inhibited bladder tumor growth through downregulation of galectin-3*. Acta Pharmacologica Sinica, 2018. **0**: p. 1-9.
90. Penny, H.L., et al., *Warburg metabolism in tumor-conditioned macrophages promotes metastasis in human pancreatic ductal adenocarcinoma*. Oncoimmunology, 2016. **5**(8): p. e1191731.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumen-Prozent
% (w/v)	Massenkonzentration
(p-)GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 <i>beta</i>
(p-)p38	Protein 38
°C	Grad Celsius
μ g	Mikrogramm
μ l	Mykroliter
Abb.	Abbildung
AGP-EPP	Arabinogalaktan aus <i>Echinacea purpurea</i>
AGP-TFA	mit Trifluoressigsäure prozessiertes Arabino- galaktan aus <i>Echinacea purpurea</i>
AKT	Protein Kinase B
APS	Ammonium Persulfat
Ara	Arabinose
AT	Österreich
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CA 19-9	<i>Carbohydrate antigen 19-9</i>
CD66	<i>Cluster of differentiation 66</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CFSE	6-Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CH	<i>Confoederatio Helvetica</i>
cJun	<i>Cellular Jun</i>
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRD	<i>Carbohydrate-recognition domain</i>
Ctrl	Kontrolle
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DE	Deutschland
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPC4/smad4	<i>Deleted in pancreatic carcinomas locus 4/ small mothers against decapentaplegic 4</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF(R)	<i>Epidermal Growth Factor (Receptor)</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreati- kographie
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
EZM	Extrazellulärmatrix
F	Frankreich
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , Fötales Kälberserum
FITC-AGP	Fluorescein-Arabinogalaktan
FOXO1, -3	<i>Forkhead-Box-Protein O1/ O3</i>

G	Gravitationskonstante
GADD45	<i>Growth Arrest And DNA Damage 45</i>
Gal	Galaktose
Gal3	Galektin-3
GalA	Galakturonsäure
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GlcA	Glukuronsäure
GM1-Gangliosid	<i>Monosialotetrahexosylganglioside</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
GTPase	Guanosin-Triphosphat hydrolysierendes Enzym
HPDE	Humane Pankreasgangepithelzellen
HPV	Humanes Papillomavirus
HSP90	Chaperon Hitze-Schock-Protein 90
hTERT	Humane Telomerase reverse Transkriptase
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IL-3, -6	Interleukin-3, -6
JP	Japan
k.A.	keine Angabe
Lgals3-Promoter	Promoter des Galektin-3 codierenden Gens
m	<i>Mouse</i>
mA	Milliampère
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein-Kinase</i>
MCP	Modifiziertes Zitruspektin
MCP-Pek	mit Pektinase prozessiertes modifiziertes Zitruspektin
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
MEK1/2	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2</i>
Min	Minuten
miRNA	<i>Micro-RNA</i>
ml	Milliliter
mM	Millimol
MMP-2	Matrix-Metalloproteinase 2
MnSOD	<i>Manganese superoxide dismutase</i>
mg	Milligramm
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MUC1	Muzin-1
NCA-160	<i>Nonspecific cross-reacting antigen</i>
N-CAM	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
nm	Nanometer
o.g.	oben genannt/e
p16, p53	Protein 16, Protein 53
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PVDF-Membran	<i>Polyvinylidene fluoride</i> -Membran

Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Raf-1	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma 1</i>
<i>rb</i>	<i>Rabbit</i>
rF	relative Feuchte
Rha	Rhamnose
Rho-A	<i>Ras homolog family member A</i>
RPMI 1640 Medium	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
s	Sekunde/n
SA	Standardabweichung
SAPK	<i>Stress-activated protein kinases</i>
SDS	Natrium-dodecyl-sulfat
shRNA	<i>Small hairpin ribonucleic acid</i>
sICAM-1	<i>Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
siGal3	Galektin-3-spezifische si-RNA
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
Src-Kinase	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (Sarcoma)</i>
Std	Stunden
SV40T	<i>Simian Vacuolating Virus 40 T Antigen</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TF-Antigen	Thomsen-Friedenreich-Antigen
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor β1</i>
ub	unbehandelt
UK	<i>United Kingdom</i>
USA	<i>United States of America</i>
V	Volt
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF(R-2)	<i>Vascular endothelial growth factor (receptor-2)</i>
vgl.	vergleiche

8.2 Abbildungsverzeichnis

1.1:	Galektin-3-Struktur, Pentamerisierung und Hemmung [25]:	4
1.2A:	Schematische Struktur des Modifizierten Zitruspektins.....	7
1.2B:	Strukturvorschlag für Arabinogalaktan aus <i>Echinacea purpurea</i>	8
1.3:	Prinzip der Metastasierung des PDAC in die Leber.....	9
3.1A:	Prinzip des <i>Adhäsionsassays</i> mit transientem siRNA-vermitteltem <i>Knockdown</i> von Galektin-3:	21
3.1B:	Prinzip des <i>Adhäsionsassays</i> unter Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden:.....	22
4.1:	Moderate Expression von Galektin-3 in PancTu1- und Panc1-Zellen.....	25
4.2	Transienter siRNA-vermittelter <i>Knockdown</i> von Galektin-3 führt zu verminderter Galektin-3-Expression in PDAC-Zellen.	26

4.3:	<i>Knockdown</i> von Galektin-3 reduziert die Migrationsfähigkeit von PancTu1- und Panc1-Zellen nicht.....	27
4.4:	Verminderte Expression von Galektin-3 in PancTu1-Zellen nach transientem siRNA-vermitteltem <i>Knockdown</i> mit 120-stündiger Transfektionsdauer. Galektin-3-Expression in PancTu1-Zellen nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (kontroll-transfiziert) bzw. Galektin-3-spezifischer siRNA (siGal3).....	28
4.5:	<i>Knockdown</i> von Galektin-3 reduziert die Migrationsfähigkeit von PancTu1-Zellen nicht.	29
4.6:	Pflanzliche Polysaccharide beeinflussen das Migrationsverhalten von PancTu1- und Panc1-Zellen nicht.....	31
4.7:	TMNK-1-Zellen exprimieren Galektin-3 im Gegensatz zu PancTu1-Zellen kaum.	32
4.8:	Transienter siRNA-vermittelter <i>Knockdown</i> von Galektin-3 führt zu verminderter Galektin-3-Expression in PDAC-Zellen.	33
4.9:	<i>Knockdown</i> von Galektin-3 vermindert die Adhäsion von PDAC- an Leberendothel-Zellen.....	34
4.10:	Einfluss der pflanzlichen Polysaccharide auf die Adhäsion von PDAC-Zellen an Leberendothelzellen.	35
4.11:	Die Behandlung mit den pflanzlichen Polysacchariden MCP-Pek bzw. AGP-TFA nach <i>Knockdown</i> von Galektin-3 führt, im Vergleich zu ausschließlichem <i>Knockdown</i> von Galektin-3, kaum zu einer zusätzlichen Reduktion der Adhäsion von Panc1-Zellen an Leberendothelzellen.	37
4.12:	Verlängerung der Behandlung mit pflanzlichen Polysacchariden verstärkt Adhäsion von PancTu1-Zellen an TMNK-1-Zellen.....	38
4.13:	Einfluss der Behandlung mit den pflanzlichen Polysacchariden MCP, MCP-Pek, AGP-EPP und AGP-TFA auf die Proteinexpression mit Galektin-3 in Beziehung stehenden Signalmediatoren in PancTu1- und Panc1-Zellen.	41
4.13:	Einfluss der Behandlung mit den pflanzlichen Polysacchariden MCP, MCP-Pek, AGP-EPP und AGP-TFA auf die Proteinexpression mit Galektin-3 in Beziehung stehenden Signalmediatoren in PancTu1- und Panc1-Zellen.	42

8.3 Sonstiges

Auswertung der *Wound-healing-Assays* mithilfe des Programms *ImageJ - Macro* zur Berechnung der zellfreien Fläche:

```
run("8-bit"); setAutoThreshold("Default dark"); //run("Threshold..."); setThreshold(255, 255);
//setThreshold(255, 255); setOption("BlackBackground", true); run("Convert to Mask");
run("Despeckle"); run("Despeckle"); run("Despeckle"); run("Despeckle"); run("Subtract Back-
ground...", "rolling=5 create"); run("Measure");
```

9 Danksagung

Danken möchte ich vor allem meiner Doktormutter, Prof. Dr. Susanne Sebens, für die Ermöglichung meiner Doktorarbeit, die stets unverzügliche und volle Unterstützung, ihre hochkompetente Betreuung sowie die große Motivation, mit der sie die Forschung verfolgt und die sie in uns weiter entfacht und gefördert hat.

Meinem Betreuer, Dr. Ole Helm, danke ich für die umfassende Einarbeitung, ständige Unterstützung, die Vermittlung naturwissenschaftlicher Problemlösungsstrategien und seine große Geduld, dank derer er Manches auch gerne mehr als einmal erklärt hat.

Für die technische Unterstützung danke ich Dagmar Leisner und Dr. Sascha Rahn, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Weiterhin danke ich auch Dr. Hendrike Knaack, Philippe Dänzer Barbosa und Dorothea Plundrich für die bereichernde und häufig auch unterhaltsame Zeit – im Labor und bei unseren gemeinsamen sportlichen Herausforderungen.

Für die Nutzung des *NyOne*-Mikroskops danke ich Dr. Reinhild Geisen sowie der AG Trauzold, für die Nutzung des *Keyence*-Mikroskops der AG Schäfer.

Mit einem Reisestipendium zum Deutschen Krebskongress 2018 wurde ich durch den Kieler Ärzteverein unterstützt – auch hierfür bedanke ich mich ausdrücklich.

Schließlich möchte ich mich herzlich bei meiner Familie bedanken, die mich stets ermutigt und in jeder Hinsicht während des Medizinstudiums und der Erarbeitung der Doktorarbeit unterstützt hat.

10 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

Schöll-Naderer M; Helm O; Heise EM; Classen B; Sebens S (2018) Inhibition of tumorigenesis and metastasis associated cellular processes in pancreatic ductal adenocarcinoma cells by targeting galectin-3. *Oncology Research and Treatment*, 2018. **41** (suppl 1): p. 64.

Schöll-Naderer M*; Helm O*; Spencker J; Pfeifer L; Rätsch T; Sebens S[#]; Classen B[#] (2019) Plant-derived saccharides and their inhibitory potential on metastasis associated cellular processes of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Carbohydrate Research*, 2019: p. 107903. DOI: 10.1016/j.carres.2019.107903

*: geteilte Erstautorenschaft

[#]: geteilte Letztautorenschaft